

モノクローナル抗体を用いた
免疫学的手法による食の安全・安心の確保

岡崎 史子

2013

目次

はじめに	．．．	1
第 1 章		
野菜に残留する殺菌剤クロロタロニルを測定するための直接競合 ELISA の開発	．．．	2
第 2 章		
大麦 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたビールの品質管理評価系の確立	．．．	19
第 3 章		
Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたリンゴ使用量の評価系の確立	．．．	36
第 4 章		
Gibberellin Regulated Protein はモモアレルギーにおける全身性反応のマーカールレルゲンである	．．．	47
論文要旨	．．．	64
公表	．．．	67

はじめに

近年、消費者の間で食の安全・安心を求める声が強くなってきた。マスメディアだけでなく、誰もがインターネットを通じて簡単に情報を発信できるようになった昨今、さまざまな情報があふれているが、その真偽の判断は個々人にゆだねられている。そこで、食に携わるものは、食の安全性を明確にし、情報を的確に消費者へ伝えることで安心を提供しなければならない。実際に、健康に直結する事項については法律などによって規制されているため、科学的根拠に基づいて安全性を示すことができる。特に、農薬や食物アレルギーなどの消費者の関心が高い分野については、日々研究が行われ、その結果を反映して規制も変更されている。しかし、いくら安全性を示すための検査であっても、操作が煩雑もしくは費用が高額な方法では、検査対象がごくわずかなものに限られてしまう。そこで本研究では、迅速・簡便に食の安全性を確保するための検査方法の確立を目指して、免疫学的手法を用いることにした。

免疫学的手法を用いるために必要な抗体は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体に大別される。ポリクローナル抗体は、動物に抗原を免疫して得られる抗血清のことである。作製は簡単であるが動物が死んでしまうと同じものは二度と得られない。また、エピトープの異なる抗体が混在するため、特異性が低くなることがある。一方モノクローナル抗体は、抗原を免疫した動物の B 細胞とミエローマ細胞を融合させることでできる、抗体産生能と増殖能を併せ持った細胞（ハイブリドーマ）が産生する抗体である。作製には時間と技術が必要であるが、一度樹立できると均質な抗体を半永久的に得ることができる。また、単一のエピトープに対する抗体であることを生かした解析が可能である。

本研究では、モノクローナル抗体の手法を用いて、まず、農薬クロロタロニルの検出系を作製した。続いて、代表的な植物アレルゲンである **Lipid Transfer Protein (LTP)** に対する評価系を作製した。さらに、LTP に対するモノクローナル抗体を作製する過程で **Gibberellin Regulated Protein (GRP)** という新規たんぱく質を見出すことができたので、そのアレルゲン性について検討した。これらの研究は、いずれもモノクローナル抗体の特徴を最大限に生かしたものである。

第1章

野菜に残留する殺菌剤クロロタロニルを測定するための

直接競合 ELISA の開発

要約

野菜中に残留するクロロタロニルを迅速・簡便に測定する直接競合 ELISA の開発を試みた。まず、ペンタクロロフェノールのカルボン酸誘導体を用いて、モノクローナル抗体(mAb)を作製した。その中でも mAb TPN9A は、クロロタロニルの測定に適していた。野菜中のクロロタロニルは、磨砕均一化後に作物由来の酵素によって速やかに分解することが知られている。その防止には、一般的にリン酸が添加（野菜/10% リン酸 (2: 1, w/v))される。直接競合 ELISA では、このリン酸の添加が測定に影響を与えるが、競合反応に用いるリン酸緩衝液のイオン強度を 100 mmol/L にすることでその影響を解消できた。至適化した直接競合 ELISA の測定範囲は、0.10~6.0 ng/mL、キュウリとナスへ添加したクロロタロニルは 78~105%と良好に回収できた。また、HPLC の測定結果とも高い相関性を認めた。開発した ELISA は、メタノール抽出とその希釈のみで、迅速・簡便にクロロタロニルを測定できた。

はじめに

クロロタロニル（テトラクロロイソフタロニトリル）は非浸透性の有機塩素系殺菌剤であり、野菜に様々な病気をもたらすウイルスや真菌に効果を示す。1964 年にクロロタロニルが開発されて以降、その効果の高さから、農場での病原菌コントロールによく使われてきた¹⁾。2011 年には約 4700 トンものクロロタロニルが日本で製造された²⁾。これは、殺菌剤のなかでもチオフェネートメタルに次ぐ多さである。カナダ、オンタリオにおける報告では、一般環境中や、野菜・果物から、クロロタロニルがよく検出されるとある^{3) 4)}。さらにクロロタロニルは、ラットの経口急性毒性 LD₅₀ 値は比較的大きい (>5000 mg/kg) にもかかわらず、国際がん研究機関はグループ 2B（発がん性の恐れがある）に分類している¹⁾。これらの理由により、残留クロロタロニルをモニタリングすることは、消費者の衛生面、安全性を確保するために重要である。

クロロタロニルは通常、GC-ECD、GC-MS や HPLC-UV、LC-MS により解析される^{5)・8)}。他の典型的な農薬と異なるのは、クロロタロニルを野菜から抽

出する際、リン酸や硫酸、ギ酸などの酸を加えて酸性にする点である^{5) 8) *1}。ゲルろ過クロマトグラフィーもしくは QuEChERS 法 (Quick (迅速), Easy (簡単), Cheap (安価), Effective (効率的), Rugged (頑健), Safe (安全)) を用いた、野菜のアセトニトリル抽出物中のさまざまな農薬の同時測定において、残留クロロタロニルの測定値に問題があったとの報告がある^{9) 10)}。また、クロロタロニルにおける QuEChERS 法の感度は野菜サンプルに酢酸を加えることで改善するということが分かっている¹⁰⁾。つまり、酸性条件が野菜からのクロロタロニルの抽出効率を高めるのである。

先にあげたような機器分析は、非常に感度がよく研究室レベルでの実験としては正確であるが、機器の値段が高く、サンプル調製も複雑で時間がかかるため、野菜の生産現場での測定に応用することは難しい。そこで、生産現場でのモニタリングに広く使える方法として、種々の農薬を検出するための ELISA が開発された¹¹⁾。ELISA 法は、機器分析に比べて迅速・簡便・安価な方法であるだけでなく、野菜の生産現場で残留農薬をモニタリングするうえでは十分に高感度で正確である。我々はすでに、野菜の残留農薬を測定するための競合 ELISA (dc-ELISA) をいくつか構築している^{12)・14)}。この dc-ELISA は、5 倍量のメタノールで抽出した液をフィルターでろ過し、メタノールの終濃度が 10% になるよう水で 7.5 倍希釈するだけという、簡単なサンプル処理のみで目的の農薬を正確に測定することができる。

水や野菜の残留クロロタロニルを測定するための、磁性ビーズを用いた ELISA の開発についての報告もある¹⁵⁾。しかしこの研究は、①ハプテンの合成方法やその構造が明らかにされていない②免疫動物による個体差が激しいポリクローナル抗体を用いている③クロロタロニルの分解を防ぐ酸性条件になっていないという 3 つの理由により追跡実験が難しい。また、野菜サンプルを市販のキットを用いて解析した結果もいくつか報告されている^{16)・18)}。これらについても当然のことながら、ハプテンの構造や抗体の性質、キットに用いた試薬の組成等は公開されていない。つまり、クロロタロニルは、最も残留量をモニタリングすべき農薬の 1 つであるにもかかわらず、免疫化学的解析法の基礎はまだ確立されていないのである。

本研究では、野菜の残留クロロタロニル解析のための ELISA を開発するために、ハプテン合成やその構造決定を行い、抗クロロタロニルモノクローナル抗体 (mAb) を樹立した。また、酸性サンプルの測定時の影響を除くための至適条件を決定した。

試料および方法

1) 試料

各種農薬 (chlorothalonil, phthalide, pentachlorophenol, quintozone, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) は, 残留農薬分析グレードのものを Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。Bovine serum albumin (BSA, Pro. No. A7030), rabbit serum albumin (RSA, Pro. No. A0764), HAT media supplement (Pro. No. H0262-10VL), HT media supplement (Pro. No. H0137-10VL), polyethylene glycol (molecular weight 1450, Pro. No. 7181-5X5ML) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), horseradish peroxidase (HRP, Pro. No. PEO-131) は Toyobo (Osaka, Japan), Freund's complete adjuvant and incomplete adjuvant は Difco Laboratories (Detroit, MI) を使用した。7 週齢, メスの BALB/c マウスは Nippon SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。RPMI 1640 は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は PAA Laboratories (Pasching, Austria) から購入した。ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Nunc MaxiSorp) は Thermo Fisher Scientific (New York, USA) から購入した。その他のすべての試薬は分析グレードの Wako Pure Chemical Industries もしくは Nacalai Tesque から購入した。

2) ハプテン合成

図 1 に示すように, クロロタロニルのカルボン酸誘導体 N-(pentachlorophenoxyacetyl)glycine (以降ハプテンとする) を新たに合成した (compound 1-4)。Lawruk らは, この化学名を明らかにしただけで, その合成方法や構造決定については明記していない¹⁵⁾。

特に断りがなければ, すべての反応は窒素もしくはアルゴン充填下で行い, 炉乾燥ガラス製品を用いた。全ての反応は薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認した。この TLC は, ガラスプレートとシリカゲルでコーティングされたアルミニウムシート (Merck, KGaA 60 F254) で行った。全ての出発物質は市販品を用い, 純化は行わなかった。生成物は紫外光照射もしくはヨウ素, p-アニスアルデヒドにより可視化した。¹H NMR (400 MHz) と ¹³C NMR (100 MHz) のスペクトルは JEOL 400 spectrometer で記録した。化学シフトは CDCl₃ 中の tetramethylsilane (0.00 ppm) との比較であらわした。赤外分光は JASCO FT/IR-230 spectrometer を用いて検出し, reciprocal centimeter (cm⁻¹) で表示した。元素分析は Yanaco CHNCORDER MT-6 を用いて行った。

Ethyl 2-(2-chloroacetamido)acetate (compound **1**; 89.8 mg, 0.56 mmol) と NaI (8.0 mg, 1.7 mmol) を dry acetone (3 mL) のと混合したものを穏やかに還流させるため、16.5 時間加熱した (oil bath temp = 56°C)。Ethyl 2-(2-iodoacetamido)acetate (compound **2**) が定量的収率で得られた。Compound **2** の構造情：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.50 (br s, 1H, -CONH-), 4.25 (q, 2H, *J* = 7.02 Hz, -CO₂CH₂CH₃), 4.05 (d, 2H, *J* = 5.19 Hz, -NHCH₂CO-), 3.75 (s, 2H, ICH₂CO-), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.02 Hz, -CO₂CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.6 (C=O, ester), 167.9 (C=O, amide), 61.8 (-CO₂CH₂CH₃), 42.2 (-NHCH₂CO-), 14.2 (-CO₂CH₂CH₃), -1.3 (ICH₂CO-) ppm.

Ethyl 2-(2-iodoacetamido)acetate (compound **2**) は純化せずにそのまま次の反応に用いた。K₂CO₃ 235.0 mg, 1.7 mmol, (3 equiv.) と 2,3,4,5,6-pentachlorophenol (149.1 mg, 0.56 mmol) を室温で混合し、穏やかに還流させるために 4.5 時間加熱し (oil bath temp = 56°C), その後 17 時間室温で攪拌した。最後に、溶媒を除いて水を加えた。この有機物は CH₂Cl₂ で抽出し、Na₂SO₄ で乾燥させた。溶媒は陰圧下で除き、silica gel (Merck, Art. No. 7734) で hexane/ethyl acetate (4:1, v/v) を移動相としてフラッシュカラムクロマトグラフィーを行い、目的物質のエチルエステルを得た (compound **3**)。収率は 53% であった。Compound **3** の構造情：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (br s, 1H, -CONH-), 4.57 (s, 2H, -OCH₂CO-), 4.27 (q, 2H, *J* = 7.02 Hz, -CO₂CH₂CH₃), 4.19 (d, 2H, *J* = 5.19 Hz, -NHCH₂CO-), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.02 Hz, -CO₂CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.4 (C=O, ester), 167.1 (C=O, amide), 150.1 (-OC₆Cl₅), 132.3 (o-C₆Cl₅), 129.2 (m-C₆Cl₅), 128.0 (p-C₆Cl₅), 71.3 (-OCH₂CO-), 61.9 (-CO₂CH₂CH₃), 41.1 (-NHCH₂CO-), 14.3 (-CO₂CH₂CH₃) ppm. Anal. C₁₂H₁₀Cl₅NO₄ · 0.6 H₂O Calcd: C 34.29, H 2.69, N 3.33 %; Found: C 33.94, H 2.29, N 3.33 %. IR (neat) 3413, 3336, 2982, 2933, 1756, 1679 cm⁻¹. Compound **3** (233 mg, 0.57 mmol) を 8 mL の NaOH/methanol solution (1 mol/L) で処理し、10% HCl で中和した。溶媒を除いたのちに、エチルアセテートで抽出し、Na₂SO₄ で乾燥させ、compound **4** を 64% の収率で得た。Compound **4** の構造情報：¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.64 (br s, -COOH), 5.10 (s, 2H, -OCH₂CO-), 4.63 (s, 2H, -NHCH₂COOH) ppm. N-(pentachlorophenoxyacetyl)glycine (compound **4**) をクロロタロニルのハプテンとして、以降実験に用いた。

3) ハプテン抗原, ハプテン酵素の調製

合成したハプテンは、活性化エステル法を用いてたんぱく質(BSA, RSA, HRP)と結合させた¹³⁾。1mLのハプテン(20 μ mol)にジメチルスルホン酸を加えた後、225 μ LのN-hydroxysuccinimide(40 μ mol)と1-ethyl-3-(3-dimethylamioethyl) carbodiimide hydrochloride(40 μ mol)を加えた。BSA, RSA, HRP 各1 mL(10 mg)と400 μ Lの活性化エステルハプテンを混合し、結合させた。ハプテン-BSAは免疫抗原とした。ハプテン-RSAは直接吸着ELISA(db-ELISA)と間接競合ELISA(ic-ELISA)に、ハプテン-HRPはdc-ELISAを構築するために用いた。

4) モノクローナル抗体の作製

mAb産生細胞は既報にしたがって作製した¹³⁾。メスのBALB/cマウス(Nippon SLCCo., Sizuoka, Japan)5匹の腹腔内に、100 μ gのハプテン-BSAと完全フロイントアジュバントのエマルジョンを免疫した。2, 4週間後にハプテン-BSA 25 μ gと不完全フロイントアジュバントのエマルジョンを腹腔に追加免疫した。最終免疫の3日後にマウスを屠殺し、脾臓(5×10^8 cells)を摘出してマウスミエローマ細胞(P3U1)(5×10^7 cells)との細胞融合を常法に従い行った³⁵⁾。融合細胞は脾臓細胞の数が 2.5×10^6 cells/mLになるように10%FBSとHT培地を添加したRPMI培地に懸濁し、96穴マイクロプレートに100 μ lずつまいた。マイクロプレートは5%CO₂, 37°Cで24時間培養したのち、10%FBSとHAT培地を添加したRPMI培地を各ウェルに40 μ lずつ加えた。ハイブリドーマが増殖し、コロニー形成を確認したのち、培養上清中に産生された抗体のハプテン-RSAに対する反応性をdb-ELISAで調べた。陽性ウェルの2次スクリーニングとして、培養上清中の抗体のクロマトグラフィーに対する反応性を調べるためにic-ELISAを行った。陽性であったウェルのハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングを2回繰り返して、mAb産生細胞を樹立した。

MAbの大量調製を目的として、プリスタン処理により腹水癌化を誘導した10週齢のBALB/cマウスの腹腔に抗体産生細胞を接種し、腹水を採取した。採取した腹水をプロテインGセファロース(GE Healthcare)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより純化し、精製mAbを得た。純度はSDS-PAGEにて確認した。

なお、動物実験は、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)」に基づき、京都女子大学・京都女子大学短期大学部動物実験規定にしたがって行った。

5) 直接吸着 ELISA と間接競合 ELISA

db-ELISA と ic-ELISA は 96 穴マイクロプレートで既報の通り行った¹³⁾。どちらの ELISA もハプテン-RSA の PBS 溶液 (5.0 µg/mL) を各ウェルに 50 µL ずつ加えて吸着させた。ic-ELISA では、培養上清反応時にクロロタロニルをメタノール/PBS (1:9, v/v) に 1 µg/mL になるように溶かしたものを加えて競合させた。

6) 直接競合 ELISA

dc-ELISA は 96 穴マイクロプレートで既報の通り行った¹³⁾。クロロタロニルはメタノールにとかし、段階的に希釈した。この希釈液を脱イオン水にて、それぞれ 2-100 倍し、クロロタロニル濃度は 50 pg/mL-50 ng/mL, メタノール濃度は 1-50% になるように調製した。ハプテン-HRP は 0.2% BSA を加えた PBS (PBS-BSA) にて、基質反応後の 450 nm の吸光度が 0.5-1 に収まるように希釈した (TPN9A と TPN11D は 50 ng/mL, TPN12E は 500 ng/mL)。しかし、ベースラインが TPN12E は 0.15, TPN9A と TPN11D は 0.08 となり, TPN12E の系では高くなった。PBS-BSA のリン酸緩衝液濃度は、10 mmol/L から 200 mmol/L の範囲で変えて条件検討を行った。各クロロタロニル溶液と野菜から調製したサンプル溶液は等量のハプテン-HRP 溶液と混合し mAb を吸着させたウェルに加え、dc-ELISA 行った。

7) 野菜サンプルの調製

クロロタロニルを散布していない農業環境技術研究所の試験農場から収穫したナスとキュウリ (サンプル A, 各 1kg), と市販品のナスとキュウリ (サンプル B, 各 2kg) を用意した。サンプル A は、それぞれ 500ml の 10% リン酸と混合し均質化したのちに野菜重量として 100g ずつ量りとり、クロロタロニルのメタノール溶液 (キュウリ : 0.5-5.0 mg/kg, ナス : 0.2-2.0 mg/kg) をそれぞれに 0.1 ml ずつ加えて添加回収試験のサンプルとした。サンプル B は、細かく刻んだのちに 100 g ずつ量りとり、0.1 ml のクロロタロニルメタノール溶液 (キュウリ : 0.5-5.0 mg/kg, ナス : 0.2-2.0 mg/kg) をそれぞれ加え、30 分放置した。各サンプルに 50 ml の 10% リン酸を加えて均質化した。

dc-ELISA 用サンプルの調製: 均質化サンプル 7.5 g を密封できる 50 mL チューブにはかりとり、メタノール 25 mL を加えて 30 分間、激しく振とう抽出した。これを 3000 rpm, 4 °C で 15 分間遠心し、上清を脱イオン水で 8.5 倍希釈し、終濃度 10% メタノールのサンプルとした。さらに希釈する場合の希釈液には、メタノール/脱イオン水 (9:1, v/v; 10% メタノール) を用いた。

HPLC 用サンプルの調製：厚生労働省が 2005 年に定めた手順にのっとり，野菜サンプルを処理した*1。

8) HPLC による解析

HPLC は Agilent 1100 series equipped with a quaternary pump とオートサンプラー，カラムオーブンをを用い，ダイオードアレイ検出器にて検出した。クロロタロニルは 246nm で検出した。カラムは SunFire C18 reversed-phase column (i. d. 4.6 mm × 250 mm, 5 µm particle size) (Waters, Milford, MA, USA) を用い，ガードカラムには (i. d. 4.6 mm × 20 mm, 5 µm particle size) を用いた。カラムオーブンの温度は 40°C に保ち，20 µL のサンプルを添加した。移動相にはメタノール/水 (70:30, v/v) を用い，流速 0.8 mL/min で流した。

結果と考察

1) 抗クロロタロニル抗体の作製

図 1 のように N-(pentachlorophenoxyacetyl)glycine をハプテンとして合成し，抗クロロタロニル mAb の作製に用いた。ハプテンは，ペンタクロロフェノールやペンタクロロニトロベンゼンと同じように，5 つのクロロ基をもっているが，クロロタロニルは 4 つのクロロ基と，クロロ基より分子量の小さいシアノ基を 2 つもっている。クロロタロニルは，抗原としての構造的な特徴が官能基のわずかな違いしかないため，得られた mAb の大半はこれら 3 農薬を区別できないか，クロロタロニルよりもペンタクロロフェノールやペンタクロロニトロベンゼンに強く反応することが予想された。我々は，クロロタロニルに強く反応する mAb 産生ハイブリドーマの中に 1 つくらいは，クロロタロニル特異的な mAb を産生するハイブリドーマがあるだろうという作業仮説をたてた。したがって，スクリーニング時に，まず db-ELISA でハプテン特異的抗体産生細胞を選び，続いて ic-ELISA でクロロタロニル特異的抗体産生細胞を選んだ。

融合細胞は，96 穴マイクロプレートに 12 枚にまき，ほとんどのウェルでコロニー形成が確認できるまで培養した。その後，各ウェルの培養上清で，固相抗原に免疫抗原（ハプテン-BSA）ではなくハプテン-RSA を用いた db-ELISA を行った。これにより，BSA に対する抗体を除くことができる。その結果，68 ウェルがハプテンに対する抗体産生細胞であることが分かった。続いて，クロロタロニル(1 µg/mL)を用いた ic-ELISA を行ったところ，15 ウェルが陽性となった。

野菜のクロロタロニル最大残留基準値 (MRLs) は 0.5 - 10 mg/kg であり，サンプル調製時の希釈を考慮すると 10 - 200 ng/mL の範囲のクロロタロニルが検出できる dc-ELISA を構築しなければならない。これを満たすであろうと考え

られた mAb は TPN9A, TPN11D, TPN12E の 3 つだけであった。これら 3 つの mAb は 2 種のスクリーニングを超えているので、クロロタロニルに特異的かつ反応性が高い抗体であると予想された。また、これらの抗体のサブクラスはすべて IgG₁ であった。3 つの mAb は、プリスタン処理したマウスの腹腔に抗体産生細胞を接種し、腹水を得ることで大量調製した。精製は Protein G にて行った。

2) dc-ELISA における mAb の反応性の比較

dc-ELISA は ic-ELISA よりも解析工程が少なく、野菜の残留農薬測定法としてよく用いられている^{18)・20)}。したがって、mAb を用いたクロロタロニル測定方法として dc-ELISA を選んだ。3 つの mAb で dc-ELISA を構築し、クロロタロニル標準液に PBS を使ったところ、反応性が不安定で測定値が 10 倍以上変動し、定量できなかった（結果省略）。これは、測定範囲のクロロタロニルの PBS への溶解度の不安定さによると考えられた。実際に、PBS の代わりに脱イオン水を用いることでこの問題は解決した（結果省略）。したがって、10%メタノール/脱イオン水に溶かしたクロロタロニル標準液を用いて 3 つの mAb の反応性を比較した（図 2）。

TPN9A の測定範囲は 0.10 ng/mL (IC₂₀) - 6.0 ng/mL (IC₈₀)であり、IC₅₀ は 1.1 ng/mL であった。TPN11D の反応性は TPN9A とよく似ておりそれぞれ、0.23 ng/mL - 7.0 ng/mL, 1.4 ng/mL であったが、TPN12E は反応性が少し高く、測定範囲は 0.092 ng/mL - 2.1 ng/mL, IC₅₀ は 0.40 ng/mL であった。また、dc-ELISA に用いるハプテン-HRP 濃度が TPN12E では 500 ng/mL と、他の 2 抗体(50 ng/mL)の 10 倍濃かった。これは、TPN12E の親和性が他の 2 抗体に比べて、ハプテン-HRP よりもクロロタロニルに対しての方が高いためである。ハプテン-HRP 濃度が濃いために、ベースラインが高くなり標準曲線が不安定になった。また、野菜由来のマトリックスによる影響をうけやすかった。そういうわけで、野菜の残留クロロタロニルを測定するための dc-ELISA に TPN12E は適さないと判断した。

3) dc-ELISA の至適条件の検討

クロロタロニルは、ホモジナイズされた農産物中で速やかに分解されることが知られている。日本で残留検査を行う際は、10%リン酸をサンプルをホモジナイズする前に加えることで、分解を防ぐ方法がとられている*1。GC や HPLC で分析する場合、添加したリン酸はサンプル調製過程で除かれるため分析結果に影響しない。一方 dc-ELISA の場合は、サンプル中の酸が除かれないため分析結果に非常に影響する。実際、ハプテン-HRP の PBS(10 mmol/L)溶液と測定

サンプルを混ぜたものは強酸性(pH 3)であった。したがって、サンプルの中和が必要であった。しかし、中和に必要な塩濃度が高くなると、クロロタロニルの溶解性が不安定になる可能性があるため、サンプルの中和は dc-ELISA の競合反応の直前で行う必要がある。そこで、ハプテン-HRP を溶かす溶液の条件検討を行った。

ハプテン-HRP を NaCl (150 mmol/L)を加えた各濃度のリン酸緩衝液 (10 - 200 mmol/L, pH 7.0) (PBS) にそれぞれ溶解した。各リン酸濃度のハプテン-HRP 溶解液と 10%メタノールに溶解したクロロタロニル標準液を混合したものを TPN9A を用いた dc-ELISA にて測定し、反応性を比較した (図 3A)。リン酸濃度 10, 40, 100 mmol/L の PBS での反応性はほとんど同じ傾向であり、PBS (200 mmol/L)よりも少し反応性が低かった。キュウリとナスから調製した測定サンプルと PBS を混ぜた液の pH を測定したところ、濃度依存性があった (図 3B)。これには、野菜間で差はなかった。PBS (100 mmol/L)では pH 6.8, PBS (200 mmol/L) では pH 7.0 となり、サンプルの酸性を打ち消すことができた。以上の結果より、PBS (100 mmol/L)をハプテン-PBS の溶解緩衝液として選択し、この条件で検量線を作製した (図 4)。

4) モノクローナル抗体の交差反応性

TPN9A, TPN11D, TPN12E の交差反応性を調べ、比較した (表 1)。TPN9A は最もクロロタロニルへの特異性が高く、フサライドへの交差性は 22%, ペンタクロロニトロベンゼンへの交差性は 17%であった。TPN11D は、フサライドに 210%, ペンタクロロニトロベンゼンに 490%, TPN12E はフサライドに 40%, ペンタクロロニトロベンゼンに 33% 交差した。野菜の残留クロロタロニルを測定するための dc-ELISA に用いる抗体を選ぶにあたって、その特異性は重要な要素である。TPN9A は、測定範囲だけでなく、その特異性においても他の 2 抗体より、dc-ELISA 構築に適していることが分かった。 _

交差反応性の解析から、TPN9A と TPN12E はハプテンのアンカー部分の小さいスペースを認識していることが予想される。なぜなら、この 2 抗体は、ニトロ基をもつペンタクロロニトロベンゼンや、フラノン基をもつフサライドよりも、ニトリル基をもつクロロタロニルに強く反応しているためである。一方、TPN11D は、ニトリル基をもつクロロタロニルよりも、クロライド基をもつペンタクロロニトロベンゼンとフサライドを強く反応していることから、深部を認識していると考えられる。

ペンタクロロフェノールは、免疫したハプテンに最も近い構造をもっているが、いずれの mAb も dc-ELISA において反応を示さなかった。Lawruk らも、同様に作製したポリクローナル抗体がペンタクロロニトロベンゼンとクロロタ

ロニルには反応したが、ペンタクロロフェノールには反応しなかったと報告している¹⁵⁾。これは、ヒドロキシル基が解離し、陰性荷電が増加した結果、パラトープと合わなくなったためかもしれない。

5) 野菜サンプルに対する dc-ELISA のクロロタロニル添加回収試験

dc-ELISA の有用性を示すため、ナスとキュウリをサンプルとして用い、2種類の添加回収試験を行った。まず、野菜 1kg に 10%リン酸を加えて粉碎し、各濃度のクロロタロニル標準液を添加した（キュウリ：0.5, 2.0, 5.0 mg/kg, ナス：0.2, 1.0, 2.0 mg/kg）。メタノール添加後、TPN9A を用いた dc-ELISA にてクロロタロニルを定量した。表 2 に示したように、キュウリサンプルでは少し低くなったが、添加量とよく合った定量値が得られた（キュウリ：78・80%，ナス：94・105%）。dc-ELISA の定量値の標準偏差は、2.0 mg/kg 以上の添加で 10 倍以上増加したが、各条件において 3 回ずつしか測定していないため、統計学的な解釈をすることは難しい。TPN9A を用いた dc-ELISA による測定値は、2.0 mg/kg 以上の濃度で不確実さが増すという前提で注意深く扱う必要がある。

次に、細かく刻んだ野菜 100 g に各濃度のクロロタロニル標準液を添加した（キュウリ：0.5, 2.0, 5.0, 10 mg/kg, ナス：0.2, 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg）。そこに 10%リン酸 50ml を加えて粉碎し、メタノールでクロロタロニルを抽出した。クロロタロニルの回収率の測定には、TPN9A を用いた dc-ELISA と、通常使われている方法である HPLC を用いた。図 5 に示すように、dc-ELISA での測定値は、HPLC の結果とよく合っており、相関係数がキュウリでは $R^2=0.997$ 、ナスでは 0.984 となった。しかし、dc-ELISA の測定値の方が HPLC より高めに出る傾向があり、特に、ナスでその傾向が強かった（傾き キュウリ：1.18, ナス：1.49）。この結果は、dc-ELISA の測定値の方が HPLC の値よりクロロタロニルの添加量に近くいため、HPLC の方が回収率が悪いと考えられる。一方、dc-ELISA でのナスの定量値がクロロタロニル添加量よりも少し多いことから、過大に定量しているとも考えられる。dc-ELISA での定量値は、HPLC での定量値よりも高いが、両者はよく相関していた。dc-ELISA を用いたクロロタロニルの定量は、生産・流通の現場のように、HPLC や GC が簡単に使えないような場所での解析に応用できる。

以上の結果より、至適化した TPN9A を用いた dc-ELISA は、野菜の残留クロロタロニルを定量するの適していることが示された。dc-ELISA は、確立されている機器分析に比べて、迅速・簡便で費用対効果が高く、ハイスループットな方法なので、日常的な生産現場での解析に特に優れているといえる。この dc-ELISA は、野菜の残留クロロタロニルの解析に、広く使われることであろう。

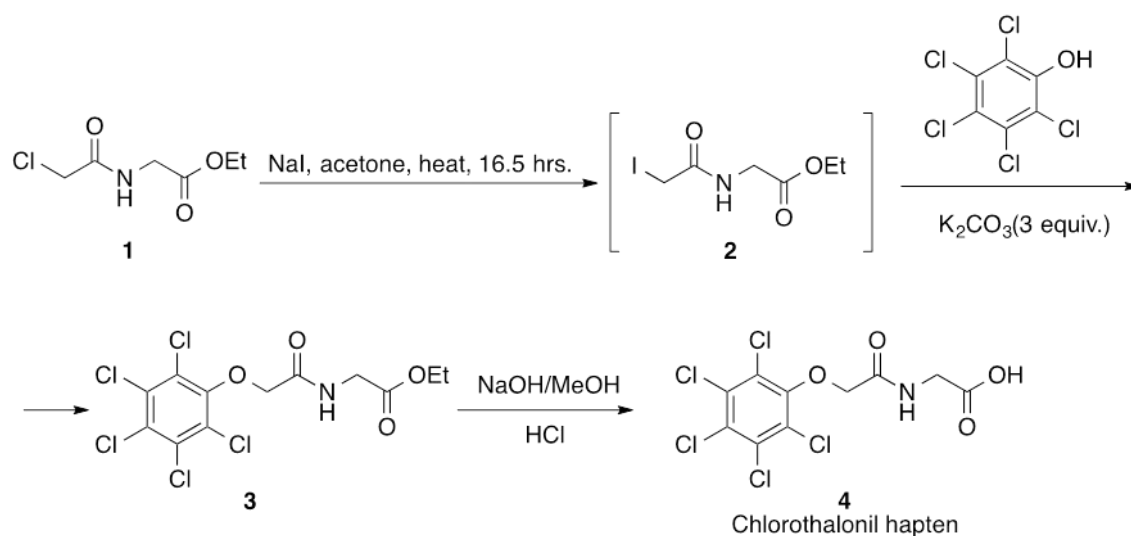


Fig. 1. Scheme of the hapten synthesis

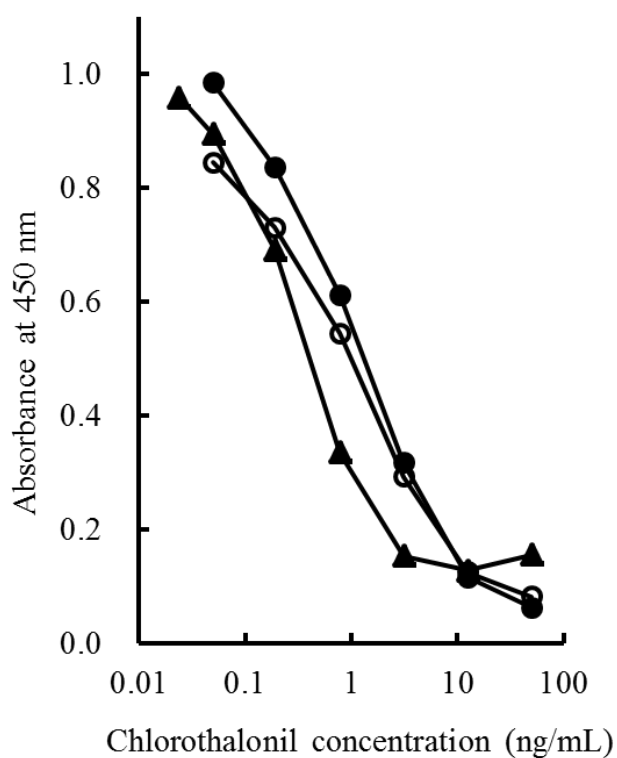


Fig. 2. Reactivity of prepared antibodies with chlorothalonil in the dc-ELISA

(○) shows MoAb TPN9A, (●) shows MoAb TPN11D, and
(▲) shows MoAb TPN12E.

Each data point is the mean of 3 replicates for independent examinations.

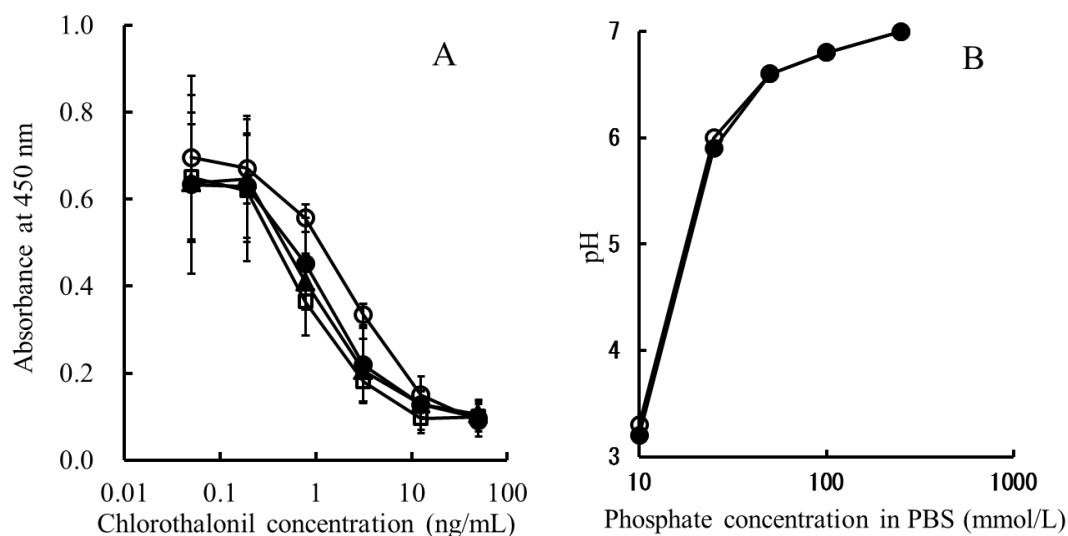


Fig. 3. Influence of PBS in the dc-ELISA with MoAb TPN9A and its neutralization effect to the determination sample

(A) shows the reactivity for the hapten-HRP conjugate solution dissolved in PBS (10 mmol/L: □, 40 mmol/L: ▲, 100 mmol/L: ●, 200 mmol/L: ○; pH 7.0).

Each data point of (A) is the mean of 3 replicates for independent \pm SD.

(B) shows pH for the mixture of PBS (10 - 200 mmol/L, pH 7.0) and the determination samples prepared from cucumber (○) and eggplant (●).

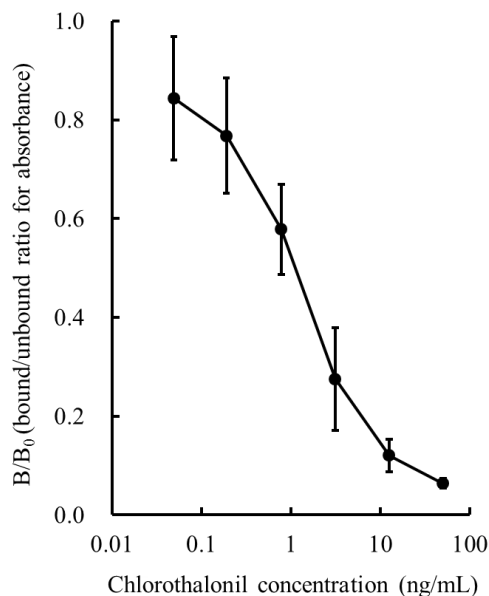


Fig. 4.

Typical standard curve for chlorothalonil in the dc-ELISA with MoAb TPN9A

Chlorothalonil was dissolved in 10% methanol with deionized water, and the hapten-HRP conjugate was dissolved in PBS (100 mmol/L, pH 7.0). Each datapoint is the mean of 5 replicates for independent examinations \pm SD.

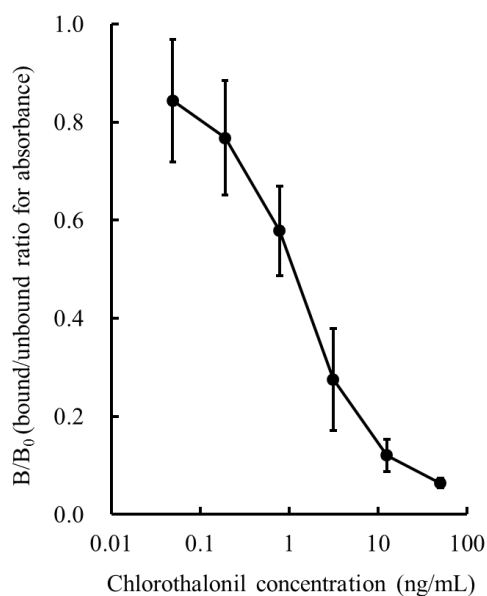
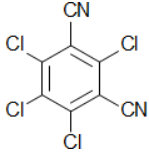
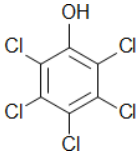
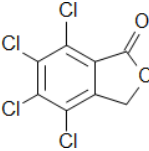
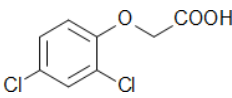
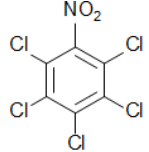
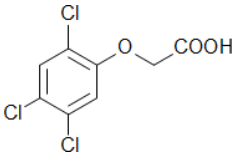


Fig. 5.
Correlation results for the dc-ELISA with TPN9A and HPLC. Cucumber and eggplant were used.

Each data point is the mean of duplicates.

Table 1. Cross-reactivity of prepared MoAbs with chlorothalonil and its structurally related pesticides

Pesticide	CR (%) ^a			Pesticide	CR (%)		
	9A	11D	12E		9A	11D	12E
chlorothalonil	100 ^b	100	100	pentachlorophenol	<0.7	<2.1	<0.3
	22	210	40		<0.7	<2.1	<0.3
phthalide				2,4-D			
	17	490	33		<0.7	<2.1	<0.3
quintozone				2,4,5-T			
							

^aCR (%) shows cross-reactivity (%) compared to chlorothalonil.

^bEach data point is the mean of three replicates for independent examinations.

PBS (100 mmol/L, pH 7.0) was used for the HRP-hapten solution.

Table 2 Recovery concentration of chlorothalonil spiked in vegetable homogenates by dc-ELISA

Sample	Spiked conc. (mg/kg)	Recovery	
		(mg/kg)	(%)
cucumber	0.5	0.40 ± 0.015^a	80
	2.0	1.60 ± 0.20	80
	5.0 (MRL ^b)	3.90 ± 0.36	78
Eggplant	0.2	0.21 ± 0.014	105
	1.0	0.94 ± 0.010	94
	2.0 (MRL)	1.90 ± 0.26	95

^aEach data point is the mean of three replicates \pm SD for independent examinations.

^bMRL shows the maximum residue limit.

PBS (100 mmol/L, pH 7.0) was used for the HRP-hapten solution.

References

- 1) MacBean, C., eds. The pesticide Manual, 16th ed. Hampshire, UK, British Crop Production Council, 2012, p. 194-196. (ISBN 978-1-901396-86-7)
- 2) Noyakuyoran. Tokyo, Japan Plant Protection Association, 2012, p. 97-100. (ISBN978-4-88926-132-5) *in Japanese*.
- 3) Ripley, B. D., Lissemore, L. I., Leishman, P. D., Denomme, M. A., Ritter, L. Pesticide residues on fruits and vegetables from Ontario, Canada, 1991-1995. J. AOAC Int., **83**, 196-213 (2000).
- 4) Kurt-Karakus, P. B., Teixeira, C., Small, J., Muir, D., Bidleman, T. F., Current-use pesticides in inland lake waters, precipitation, and air from Ontario, Canada. Environ. Toxicol. Chem., **30**, 1539-1548 (2011).
- 5) el-Nabarawy, I. M., Carey, W. F., Improved method for determination of chlorothalonil and related residues in cranberries. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **71**, 358-360 (1988).
- 6) Hladik, M. L., Kuivila, K. M. Analysis of chlorothalonil and three degradates in sediment and soil. J. Agric. Food Chem., **56**, 2310-2314 (2008).
- 7) Jongen, M. J., Engel, R., Leenheers, L. H. Determination of the pesticide chlorothalonil by HPLC and UV detection for occupational exposure assessment in greenhouse carnation culture. J. Anal. Toxicol., **115**, 30-34 (1991).
- 8) Yamamoto, A., Miyamoto, I., Kitagawa, M., Moriwaki, H., Miyakoda, H., Kawasaki, H., Arakawa, R. Analysis of chlorothalonil by liquid chromatography/mass spectrometry using negative-ion atmospheric pressure photoionization. Anal. Sci., **25**, 693-697 (2009).
- 9) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by gas chromatography with nitrogen-phosphorus and flame photometric detection after gel permeation chromatography and a two-step minicolumn cleanup. J. AOAC Int., **86**, 1241-1251 (2003).
- 10) Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. J. AOAC Int., **88**, 615-629 (2005).

- 11) Van Emon, J. M. Bioanalytical methods for food contaminant analysis. *J. AOAC Int.*, **93**, 1681-1691 (2010).
- 12) Kondo, M., Yamashita, H., Uchigashima, M., Kono, T., Takemoto, T., Fujita, M., Saka, M., Iwasa, S., Ito, S., Miyake, S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for residue analysis of the insecticide emamectin benzoate in agricultural products. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 359-364 (2009).
- 13) Kondo, M., Tsuzuki, K., Hamada, H., Yamaguchi (Murakami), Y., Uchigashima, M., Saka, M., Watanabe, E., Iwasa, S., Narita, H., Miyake, S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for residue analysis of the fungicide azoxystrobin in agricultural products. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 904-911 (2012).
- 14) Uchigashima, M., Watanabe, E., Ito, S., Iwasa, S., Miyake, S. Development of immunoassay based on monoclonal antibody reacted with the neonicotinoid insecticides clothianidin and dinotefuran. *Sensors*, **12**, 15858-15872 (2012).
- 15) Lawruk, T. S., Gueco, A. M., Jourdan, S. W., Scutellaro, A. M., Fleeker, J. R., Herzog, D. P., Rubio, F. M. Determination of chlorothalonil in water and agricultural products by a magnetic particle-based enzyme immunoassay. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1413-1419 (1995).
- 16) Yeung, J. M., Newsome, W. H. Determination of chlorothalonil in produce by enzyme immunoassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 444-450 (1995).
- 17) Takahashi, Y., Hayashi, A., Sakurai, A., Umezu, T., Wada, Y. Immunological analysis of deposition of chlorothalonil applied by fogging techniques. *J. Pestic. Sci.*, **21**, 65-67 (1996).
- 18) Watanabe, E., Miyake, S., Ito, S., Baba, K., Eun, H., Ishizaka, M., Endo, S. Reliable enzyme immunoassay detection for chlorothalonil: fundamental evaluation for residue analysis and validation with gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1129**, 273-282 (2006).
- 19) Watanabe, E., Miyake, S. Immunoassay for iprodione: key estimation for residue analysis and method validation with chromatographic technique. *Anal. Chim. Acta*, **583**, 370-376 (2007).

- 20) Watanabe, E., Baba, K., Miyake, S. Analytical evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for neonicotinoid dinotefuran for potential application to quick and simple screening method in rice samples. *Talanta*, **84**, 1107-1111 (2011).
- *1) Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan,
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/siken.htm> [11 September 2013]. *in Japanese*

第2章

大麦 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いた ビールの品質管理評価系の確立

要約

はじめに大麦粒中の Lipid transfer Protein (LTP)がアレルギー患者血清中の IgE と反応したことから、LTP は IgE 結合タンパク質であることを確認した。次に大麦粉から純化した LTP に対するモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA を確立した。この ELISA は大麦 LTP を 0.3~3ng/ml の範囲で定量することができ、小麦やはと麦、ライ麦とは交差しなかった。さらには、この ELSIA を用いて酢や味噌、ビールなどの発酵食品中の大麦 LTP を検出することができた。同一品種のビールであれば、製造工場や製造日が異なっても LTP 濃度はほぼ一定であった。LTP はビールの泡の形成と安定性に寄与することに加えてアレルゲンであるため、ビール中の LTP 濃度をコントロールし、監視することは有益である。したがって、本定量系はビールの品質管理の適切な評価系として利用できると思われる。

はじめに

Non-specific lipid transfer protein (LTP) は植物界に広く分布する分子量約 9 kDa の低分子量タンパク質である。脂質結合能を有することから、当初は細胞内の膜脂質の輸送に関与すると考えられていたが、シグナル配列を持つプレタンパク質として生合成されるため、現在では細胞外分泌タンパク質であることがわかっている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。LTP には LTP1 と LTP2 が報告されているが、本稿では LTP1 に焦点をしぼり、LTP1 を LTP と省略する²⁾。

LTP は植物の細胞壁や表皮組織において多く発現されており、干ばつや寒冷、高塩濃度などのストレスによって誘導される^{1)5)~7)}。また、細菌やカビ、ウイルスの攻撃に対する防御機構での LTP の生理的役割についても報告されている^{8)~11)}。これらのことより、LTP は植物の生体防御に重要な役割を果たしている一連のタンパク質である pathogenesis-related protein (PR タンパク質) のうち PR-14 に分類されている¹²⁾。

LTP は、分子内の 8 個のシステイン残基が全て S-S 結合を形成しているため、コンパクトで安定な高次構造を持つ。一般にこのような構造を持つタンパク質は、加熱や消化酵素に対して耐性を示すため、アレルゲンとなる場合が多いと

考えられている。事実、LTP は果物や野菜、穀類、ナッツ類、花粉のアレルゲンとして同定されている^{13)~17)}。LTP には脂質と結合可能な疎水性の空洞部分が存在し、この部分が LTP のアレルゲン性に関与していると報告されている²⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに、LTP は植物学的に種が異なってもアミノ酸配列のホモロジーが高く、互いに交差反応するため、汎アレルゲンとして問題となっている²⁾²⁰⁾²¹⁾。大麦 LTP も加熱や消化酵素に対して抵抗性を示すため、ビール製造時の発酵工程で分解されずに残存し、ビールの泡の形成や安定性に寄与している²²⁾²³⁾。また、ビールの主要アレルゲンとして分子量 44 kDa のプロテイン Z と LTP が報告されているが、プリックテストではプロテイン Z よりも LTP の方が反応性は高いようである^{15)24) 25)}。近年、世界的に、食物アレルギーの発症予防のためにアレルゲンを含む食品の表示の徹底がはかられ、アレルゲン検出法の開発が活発化している。日本では 2002 年に世界に先駆けて、特定原材料表示が定められた²⁶⁾。このような情勢に鑑み、本研究では、大麦粉 LTP に対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いた免疫学的定量系を確立し、ビールの品質管理の評価系として応用することを目的として行った。

試料と方法

1) 大麦 LTP の精製

大麦粉 80 g に 3 倍量の蒸留水を加えて室温にて一晩抽出を行い、遠心分離 (10,000×g, 4°C, 20 分間) 後、上清を回収した。この水抽出液に硫酸アンモニウムを 30%飽和濃度加えて沈殿画分を除き、上清画分が 80%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えた。その沈殿画分が 1.2 mol/L 硫酸アンモニウム濃度になるように 20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7 で希釈後、1.2 mol/L 硫酸アンモニウム/20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7 により平衡化した TOYOPEARL Butyl -650M (2.5×10cm) (Tosho, Tokyo, Japan) にかける、1.2~0 mol/L 硫酸アンモニウムによるグラジエント溶出を行った。それぞれの溶出画分を SDS-PAGE にかけて約 9 kDa にたんぱく質が認められたものを合わせ、20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 に対して透析した (MWCO 3500Da, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA)。それを同溶液により平衡化した TOYOPEARL CM -650M (1.6×5cm) (Tosho, Tokyo, Japan) にかける、0~0.3 mol/L NaCl/20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 によるグラジエント溶出後、LTP 画分を得た。LTP の純度は SDS-PAGE を用いて確認した。純化した大麦 LTP は水で透析後、凍結乾燥し、使用するまで -20°C にて保存した。小麦 LTP も小麦粉より同様の手順に従い純化した³³⁾。タンパク質の定量はウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) を標準品として、DC プロテインアッセイ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて行った。

2) 電気泳動とウェスタンブロッティング

SDS-PAGE での LTP の確認は、ラミーらの方法に従い、10%均一ゲル (NuPAGE Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った³⁴⁾。サンプルは、2% (w/v) SDS と 10mM 2-メルカプトエタノールを含む Tris-HCl buffer (pH6.8) に溶解し、100℃、5 分間加熱した。泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー R-250 で染色し、9kDa 付近のバンドを LTP として確認した。

大麦、小麦、はとむぎ、ライ麦の抽出液はそれぞれタンパク質量 8μg になるようにサンプル調製し、電気泳動にかけ、ポリビニルジフルオライド (PVDF) 膜に転写した。転写した膜は、5%スキムミルクを含む PBS で 1 時間ブロッキングし、抗大麦 LTP モノクローナル抗体と、室温で 1 時間反応させた。これを 0.15M NaCl を含む pH7.4 の 10mM Tris buffer (TBS) で数回洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG と室温で 1 時間反応させた。TBS で丁寧に洗浄したのち、アルカリホスファターゼ発色キットにてたんぱく質バンドを検出した。一次抗体にヒト血清を用いた際には、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgE を用いた。

3) N 末端アミノ酸解析

精製した大麦 LTP は、プロテインシーケンサー (Procise 491HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて N 末端側アミノ酸配列の解析を行い、既知の大麦 LTP の配列と比較した。

4) モノクローナル抗体の作製

8 週齢メスの Balb/c マウス (Nippon SLCCo., Sizuoka, Japan) 13 匹の腹腔内に、100μg の大麦 LTP と完全フロイントアジュバントのエマルジョンを免疫した。2, 4 週間後に大麦 LTP 50μg と不完全フロイントアジュバントのエマルジョンを腹腔に追加免疫した。6 週間後に最終免疫として大麦 LTP 10μg を PBS 溶液にして腹腔内に投与した。最終免疫の 3 日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出して、マウスミエローマ細胞 (P3U1) との細胞融合を常法に従って行った³⁵⁾。融合細胞は HAT 培地に懸濁させたのち 96 穴培養プレートにまき、37℃で培養した。2 週間後、各ウェルの培養上清中の大麦 LTP に対する抗体の存在を確認するため、固相 ELISA によりスクリーニングを行った。大麦 LTP に対して高い反応を示したウェルのハイブリドーマは、5%BriClone を含む HT 培地に懸濁し、限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返してモノクローナル抗体産生細胞を樹立した。樹立した細胞は大量培養を行い、培養上清中に分泌する mAb について、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウス mAb アイソタイピングキット (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用いて調

べた。また、プリスタン処理により腹水癌化を誘導した 10 週齢の BALB/c マウスの腹腔に抗体産生細胞を接種し、腹水を採取した。採取した腹水をプロテイン G セファロース (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより純化し、精製 mAb を得た。さらに、抗体にペルオキシダーゼを直接標識することにより、酵素標識 mAb を作製した³⁶⁾。

なお、動物実験は、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号)」を遵守し、京都女子大学・京都女子大学短期大学部動物実験規定に従い行った。

5) LTP 定量用抽出液の調製

固形試料は、ホモジナイザーで均質化したのちに 1 g をはかりとり、PBS19 mL を混合して、一晚振とう抽出を行った。抽出液を遠心分離 (3,000×g, 4℃, 20 分間) して上清を回収し、ろ過 (No.2, Advantec, Tokyo, Japan) を行い、ろ液を試料溶液とした。ビールはそのままを試料溶液とした。

6) 酵素免疫測定法

固相 ELISA は、96 穴マイクロプレート (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) の各ウェルに 2μg/ml の大麦 LTP を 50μl ずつ入れ、4℃ で 1 晩放置し、固相化する。その後、200μl の 1%BSA でブロッキングした。培養上清 50μl を各ウェルに入れ、37℃, 1 時間反応させた。0.02% tween 20 を含む TBS (TBS-T) にて洗浄後、100μl のアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を加え、37℃ で 1 時間反応させた。洗浄後、基質として 100μl の p-ニトロフェニルリン酸を 1mg/mL 含むジエタノールアミン緩衝液 (10%ジエタノールアミン, 0.5 mmol/L MgCl₂, pH 9.8) を加え、37℃, 1 時間反応させたのち、主波長 415 nm, 副波長 655 nm における吸光度の差をマイクロプレートリーダーにより測定した。

サンドイッチ ELISA は、5μg/ml の抗大麦 LTP mAb 50μl で固相化後、ブロッキングしたマイクロプレートに 50μl の大麦 LTP (0-100ng/ml) または試料を加え、37℃ で 1 時間反応させた。洗浄後、50μl のペルオキシダーゼ標識抗大麦 LTPmAb を加え、37℃ で 1 時間反応させた。最後に、洗浄後したプレートの各ウェルに 3,3', 5,5' -テトラメチルベンジジン (TMB) を基質として 100μl ずつ加えて発色させたのち、反応停止液 (1 mol/L 硫酸) を 100μl ずつ添加後、主波長 450 nm, 副波長 655 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

結果考察

1) 精製大麦 LTP の評価

大麦 LTP は、硫安分画、疎水性クロマトグラフィ、陽イオン交換クロマトグラフィを用いて市販の大麦粉から精製した。これを SDS-PAGE にかけて分子量 9kDa 付近に単一たんぱく質が確認できたので、N 末端アミノ酸配列を解析したところ、LN(X)GQVDS なる配列が得られた。これは Douliez らが報告している大麦 LTP の N 末端アミノ酸配列と一致した²⁾。従って、精製した 9kDa のタンパク質が大麦 LTP であると同定した(図 1)。精製大麦 LTP を用い、E1%=10 と仮定した紫外吸収法と、ウシ血清アルブミンを標準とした DCTM protein assay により大麦 LTP 濃度を測定した結果、紫外吸収法で測定した LTP 濃度は DCTM protein assay で測定した濃度と比較して約 1/3 であり、LTP の 280 nm における吸光係数が 3.3 程度であることが示された。この違いは、大麦 LTP が構成アミノ酸としてトリプトファンを持たず、チロシンが 3 残基しか存在しないことに起因していると考えられる。また、Paridon らの方法²⁸⁾により、純化した LTP がリン脂質輸送活性を持つことを確認した(結果省略)。これにより、LTP を変性させずに調製できたことが明らかになったので、この方法で精製した大麦 LTP を以降の実験に用いることとした。

2) 大麦 LTP のアレルゲン性

大麦 LTP のアレルゲン性を評価するために、大麦、小麦、リンゴに対する IgE をもつ食物アレルギー患者 10 名の血清(表 1)を用いてイムノブロットを行い、大麦たんぱく質に対する IgE の結合性を検証した(図 2)。5 番と 10 番の血清では大麦 LTP に対する反応は見られなかったが、他の 8 検体は全て反応を示した。大麦抽出液を SDS-PAGE にかけたタンパク染色では、14, 28, 60kDa のバンドも LTP に相当するバンドと同程度存在するにも関わらず、IgE が結合したのは、LTP に相当するバンドだけだった。この結果は、LTP が、大麦を使用した食品の重要なアレルゲンであることを示している。したがって、大麦加工食品において、LTP の混入、残留には十分注意する必要がある。

3) 抗大麦 LTP モノクローナル抗体の作製と解析

13 匹のマウスに大麦 LTP を免疫し、抗体価が高いマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合した。固相 ELISA によるスクリーニングの結果、大麦 LTP に対して高い特異性を示す抗体を産生する細胞株を 4 クローン(5-4, 10-1, 10-4, 12-3)樹立することができた。いずれの mAb も IgG1 κ であった。

次に、得られた 4 抗体の他の穀物の LTP に対する交差反応性をウェスタンブロットにより解析した。大麦、小麦、えん麦、はと麦、ライ麦の水抽出液を

SDS-PAGE にかげ、たんぱく染色を行った結果、大麦、小麦、はと麦、ライ麦では9 kDa 付近にバンドが認められたが、えん麦には認められなかった(図 3A)。ウェスタン解析の結果、4 抗体すべてにおいて大麦 LTP をはっきりと確認できた(図 3B)。5-4、10-1、10-4 の 3 抗体は、他の穀類に交差反応を示さなかったが、12-3 はライ麦 LTP に若干交差した。これは、12-3 が、大麦とライ麦で相同性の高い配列をエピトープとしていることに起因すると考えられる。この 4 抗体が、主要な食物アレルギーである卵、乳、ピーナッツ、カニ、エビに交差しないことは確認している(結果省略)。大麦 LTP に対するモノクローナル抗体はすでに報告されており、そのエピトープも明らかにされている²⁹⁾。しかし、その交差反応性や定量系については知られていない。

4) サンドイッチ ELISA による大麦 LTP の定量

大麦 LTP を高感度に定量するために、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA を構築した。樹立した 4 抗体それぞれを一次抗体として固相化し、ペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体を二次抗体とした。図 4 に示すように、6 つの組み合わせにおいて大麦 LTP を検出することができた。中でも、1 次抗体に 10-4、2 次抗体にペルオキシダーゼ標識した 5-4 を用いる組み合わせが最も感度がよく、0.3 – 3 ng/ml の範囲において定量が可能であった(図 4C)。また、この系の小麦 LTP に対する感度は、大麦 LTP に対する感度の 1/300000 であった(図 5)。したがって、このサンドイッチ ELISA は極めて高感度かつ特異的な大麦 LTP の定量系であるといえる。

次に、この定量系を用いて大麦加工食品の定量を試みた(表 2)。大麦には、ビールや焼酎に使用される二条大麦と押麦や麦茶用の六条大麦の 2 つの品種があり、それぞれ用途に合う品種が選択されている。精製に用いたのはビール製造用の二条大麦粉であったが、押麦においても LTP が定量できたことから、六条大麦にも二条大麦とほぼ同程度の LTP が含まれているものと思われる。一方、この定量系では、大麦葉から LTP を検出することはできなかった。これは、大麦の中でも、葉と穀粒の LTP のアミノ酸配列が異なるためであると考えられる(図 1)²⁾。大麦加工食品の LTP 含量は、原料大麦に比べて著しく低かった。一般に、LTP は安定な構造をとっているため熱に耐性があるといわれているが、Nierop らは、LTP が 96°C でいくらか変性すると報告している²³⁾。大麦加工食品中の LTP も、モノクローナル抗体が認識できないような変性状態にあると考えられる。加えて、加工工程の加熱により食品成分が凝集し、抽出効率が低下した可能性もある。我々は、熱変性したオボムコイドのアレルゲン性について報告したことがある³⁰⁾。オボムコイドは、LTP 同様にジスルフィド結合によって安定な立体構造をもち、熱に対して安定な卵の主要アレルゲンである。した

がって、アレルギー定量する場合は熱変性の程度に関係なく、総量を評価できる方法が望ましい³¹⁾。しかし、本定量系では、100℃で10分間加熱した大麦 LTP の定量値が、未変性のものに比べて低い値となった（結果省略）。

日本において、ELISA によるスクリーニングは、食品中アレルギー検出法とし国から通知されている²⁶⁾。食品ごとにターゲットたんぱく質が決められており、それぞれ、鶏卵はオボアルブミン、牛乳はカゼインと β -ラクトグロブリン、ピーナッツは Ara h2、小麦はグリアジンである。味噌や酢、ビールのような発酵食品においては、小麦が原料として使われているにもかかわらず、小麦グリアジンが加工工程で加水分解してしまうため、現在の通知法では定量できないという問題がある³²⁾。そこで我々は、発酵食品中の小麦使用量を評価する方法として、たんぱく質分解酵素に対して安定である LTP をターゲットとする系を開発している³³⁾。本研究でも同様に、ビールや味噌、酢といった、大麦使用発酵食品において LTP を定量できたことは、注目に値する（表 2）。

5) ビール中の大麦 LTP の定量

大麦 LTP は、ビール中の主要なたんぱく質成分である¹⁵⁾²²⁾⁻²⁴⁾。また、大麦 LTP はアレルギーであり、ビールの泡の形成因子でもあるため、ビール中の含量をモニタリングすることが、品質管理においてきわめて重要である。本研究で開発した定量系を用いたビールの品質評価を紹介する。

ビールの製造方法は大きく3つに分類できる。日本やドイツ、オランダで行われている下面発酵では、4–13℃で4–6週間発酵させる。イギリスやベルギーで行われている上面発酵は20℃で2週間発酵させる。ベルギーで広く行われている自然発酵では空気中の酵母を使って発酵させる。定量結果を見ると、これら3つの製造方法の違いは LTP の量にほとんど影響していないと考えられる（図 6）。しかし、11–17 は全てベルギー製であるが、同じ製造国でも10–20 倍異なるものもあり、それぞれの銘柄ごとの製法の違いや使用する原料の違いが LTP 量に反映していると思われた。

次に、4か所の工場で作られた（①–④）、4種のビール（A–D）の LTP 含量を、異なる工場間および製造日間で比較検討した（図 7）。どの製品においても LTP 含量の工場間、製造日間の差はほとんどなく、ビールの製造工程の異常をチェックする指標として LTP が利用可能であることが示された。またビール B のあるロットを飲酒して蕁麻疹を発症したという消費者からのクレームがあったので、同ロットの保管サンプルの LTP を定量した結果、他のロットの値と比べて大きな違いはなかった（図 7B, X）。したがって、少なくとも同一ロットの主要アレルギー含量に異常はなかった旨を報告することができた。このように、

本定量系を用いることで、ビールの品質に関する消費者からの問い合わせに対して科学的根拠に基づいた情報を迅速・簡便に提供することが可能となる。

大麦 LTP は、ビールの泡の形成と安定性に寄与するたんぱく質であり、また、アレルギーであることから、ビール中の LTP 含量をモニタリングし、管理することは重要である。本稿では、大麦 LTP に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA を、品質管理や製品評価に便利な方法として紹介した。今後、製品中の LTP 含量と麦汁加熱温度、発酵方法、麦芽の投入量など製造方法との相関、さらには製品の物性や味との関連を明らかにしていくことが必要であると考えている。以上の結果より、LTP をターゲットとした本定量系は、大麦発酵食品における大麦使用量の評価や大麦飲料の品質管理や新製品開発にも有効な情報を提供してくれるものと考えられる。

Figure 1. Deduced amino acid sequences of barley seed and leaf lipid transfer proteins (LTPs) and wheat seed LTP from their nucleotide sequences (NLT1_HORVU, NLT3_HORVU, and NLTA_WHEAT). The blue highlight indicated the homologous amino acid in the alignment of these amino acid sequences.

		5	10	15	20
barley (seed)		L N C G Q V D S	K M K P C L	T Y V Q G G	
barley (leaf)	A	I S C G Q V S S	A L S P C I	S Y A R G N	
wheat (seed)		I D C G H V D S	L V R P C L	S Y V Q G G	
		25	30	35	40
barley (seed)	-	P G P S G E C C	N G V R D L H N Q A Q		
barley (leaf)	G	A K P P V A C C	S G V K R L A G A A Q		
wheat (seed)	-	P G P S G Q C C	D G V K N L H N Q A R		
		45	50	55	60
barley (seed)		S S G D R Q T V C N C L K G I A R G I H			
barley (leaf)		S T A D K Q A A C R C L K S L A T S I K			
wheat (seed)		S Q S D R Q S A C N C L K G I A R G I H			
		65	70	75	80
barley (seed)		N L N L N N A A S I P S K C N V N V P Y			
barley (leaf)		G I N M G K V S G V P G K C G V S V P Y			
wheat (seed)		N L N E D N A R S I P P K C G V N L P Y			
		85	90		
barley (seed)		T I S P D I D C S R I Y			
barley (leaf)		P I S M S T D C N K V H			
wheat (seed)		T I S L N I D C S R V			

Table 1. Characteristics of sera from patients with food allergy.

Patient No.	Barley	Wheat	Apple	Sensitization
	IgE kU/L			
1	1.2	-	6.4	wheat products, nuts, beans
2	9.8	33.1	25.6	egg white
3	15.8	14.3	14.4	wheat products, nuts, beans
4	-	-	11.7	apple, pear, carrot, pollen
5	25.6	46.8	19.2	peach, apple, pear, fish, meat
6	9.5	17.8	0.9	nuts, beans
7	5.6	5.7	1.2	grass pollen
8	5.5	5.4	4.7	fish
9	6.4	2.9	-	plum, dates
10	-	-	11.5	milk products, egg, nuts, beans

-: not determined.

Figure 2. The reactivity of sera IgE obtained from food allergic patients with proteins in barley extract. (A) SDS-PAGE pattern of molecular mass markers (a), 8 μ g of PBS-extracted barley proteins (b), and 2 μ g of barley LTP (bLTP) (c). (B) Western blotting pattern of PBS-extracted barley proteins (8 μ g) with sera from food allergic patients (No. 1–10). IgE was visualized with alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgE. The IgE characteristics of sera from allergic patients are shown in Table 1.

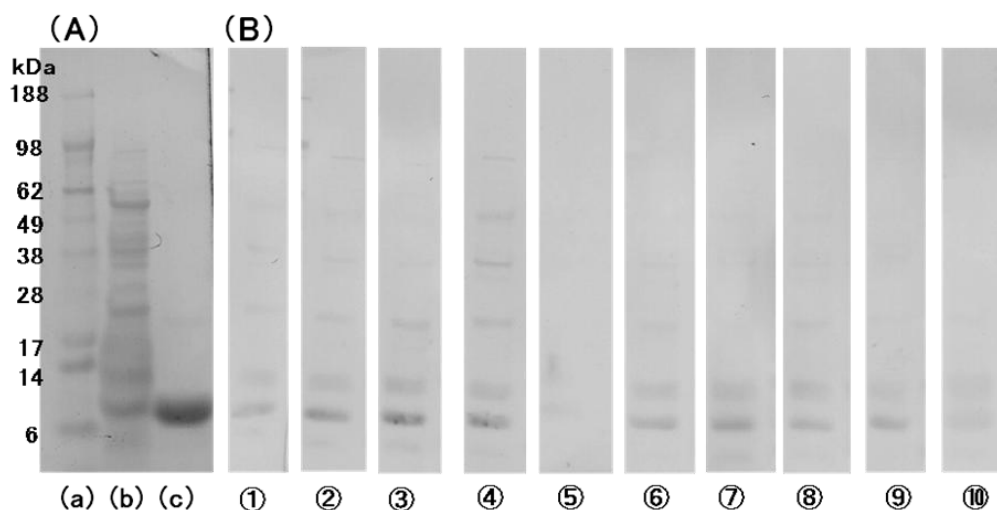


Figure 3. Cross reactivity of anti-bLTP monoclonal antibodies with other cereal grain LTPs. (A) SDS-PAGE pattern of molecular mass markers (a), 2 μ g of bLTP (b), and 8 μ g of PBS-extracted proteins from barley ①, wheat ②, adlay ③, and rye ④. (B–E) Western blotting pattern of PBS-extracted barley proteins (8 μ g) with various established anti-bLTP monoclonal antibodies (mAbs). (B), 5-4; (C), 10-1; (D), 10-4; (E) 12-3. =

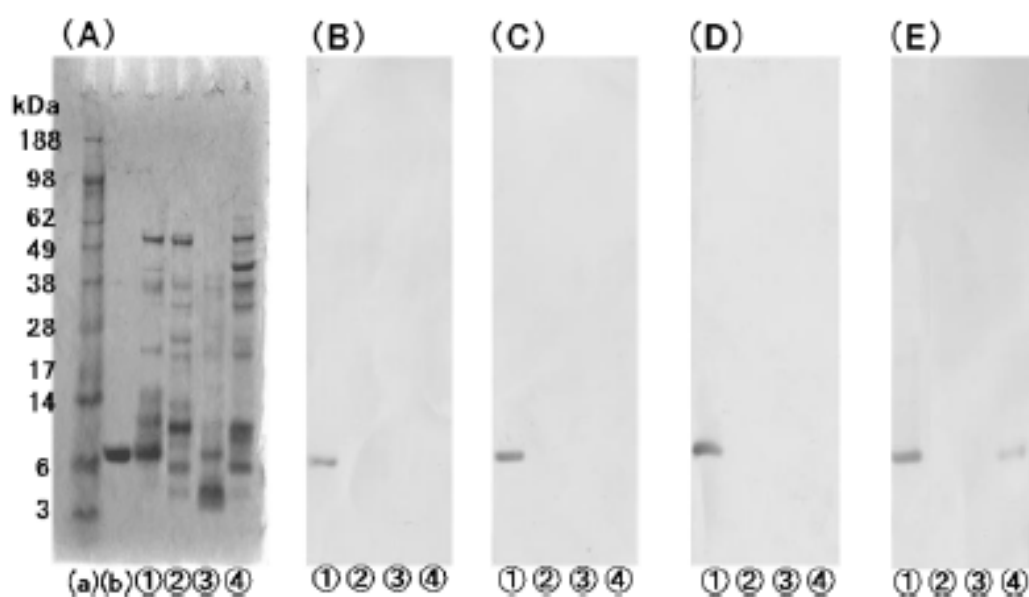


Figure 4. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the quantitative analysis of bLTP. Sandwich ELISAs were constructed with mAb 5-4 (A), 10-1 (B), 10-4 (C), or 12-3 (D) as a solid-phase antibody and peroxidase-conjugated mAb 5-4 (●), 10-1 (○), 10-4 (▲), or 12-3 (△) as a second antibody.

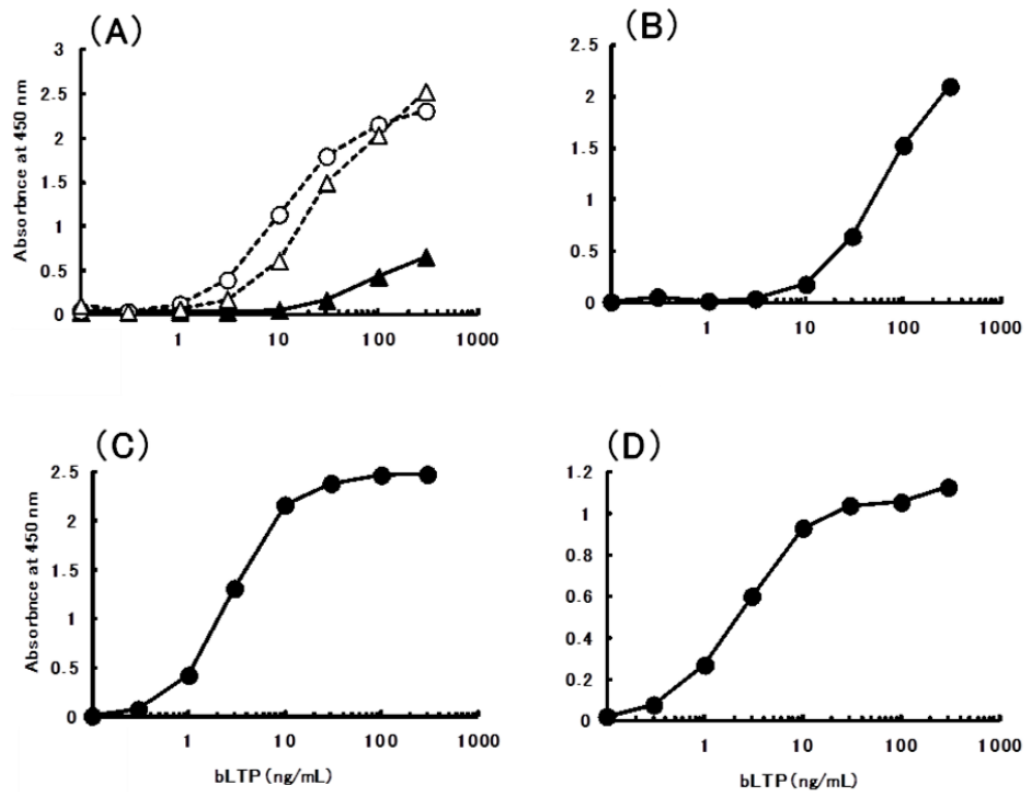


Figure 5. Reactivity of the 10-4/5-4 sandwich ELISA system to barley and wheat LTPs. Barley (●) or wheat LTP (○) was determined by the sandwich ELISA, constructed with mAb 10-4 as a solid-phase antibody and peroxidase-conjugated mAb 5-4 as a second antibody.

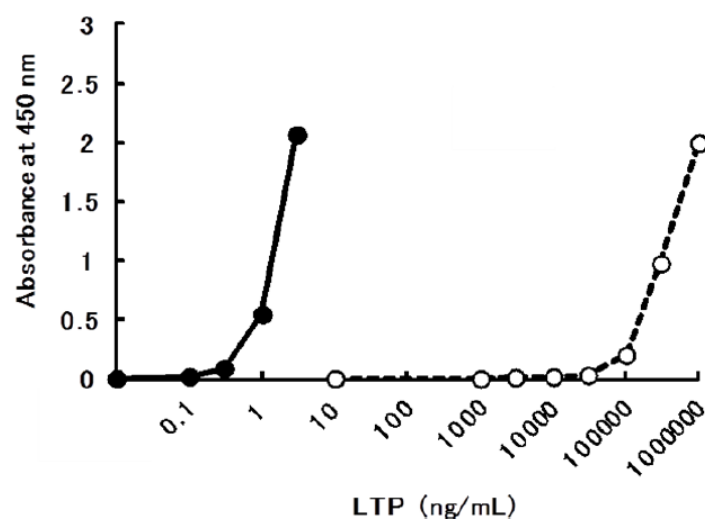


Table 2. Barley LTP content.

Food	$\mu\text{g/g (mL)}$
Two-row barley flower	393.7
Two-row barley flower	301.3
Barley leaf	-
Hattaiko *	0.1
Roasted barley grain **	-
Barley miso ***	18.3
Malt vinegar	21.0
beer	2.6

-: not detected; * Roasted and grounded barley flour used for Japanese sweets; ** Raw material for popular Asian tea; *** Soybean paste made with barley malt.

Figure 6. Barley LTP levels in beer samples prepared by three different brewing processes. Concentration of bLTP was determined by the 10-4/5-4 sandwich ELISA system. I, bottom fermentation; II, top fermentation; III, spontaneous fermentation. No. 1–7, Japanese products; 8, English product; 9, German product; 10, Irish product; 11–17, Belgian products.

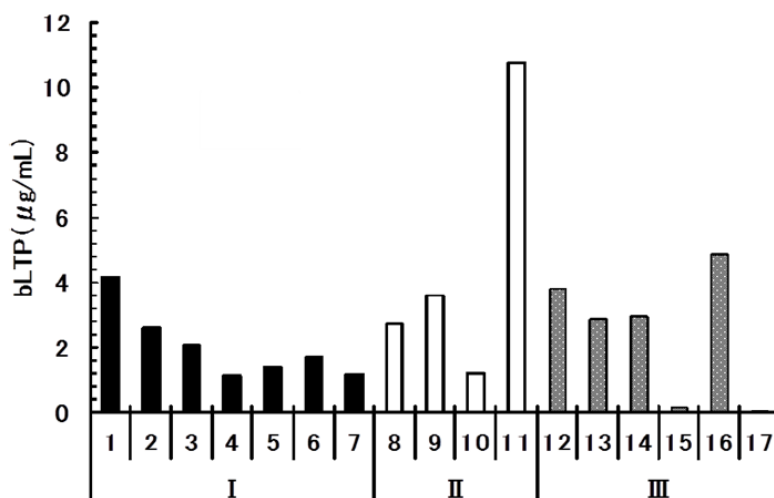
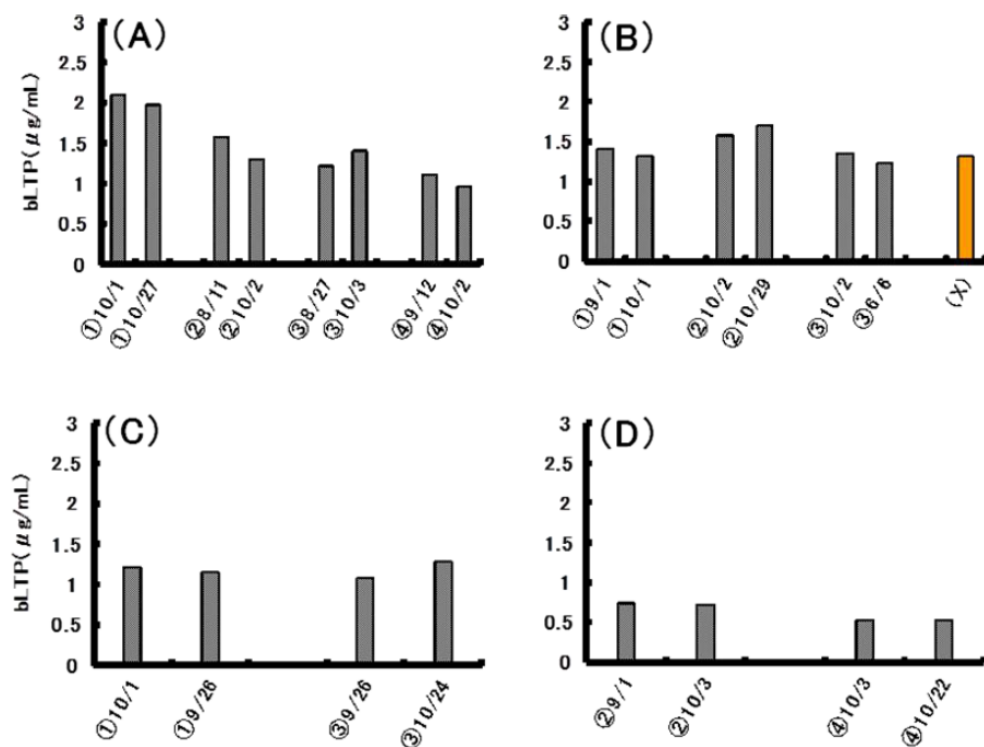


Figure 7. Comparison of bLTP content in beer between different lots of production. Four kinds of beers (A–D) produced in four different factories (①–④) and different days were obtained. The amount of bLTP was determined by the 10-4/5-4 sandwich ELISA system. ① 10/1 indicates that it was produced in factory ① on October 1st. (X) indicates the same lot product that was claimed by a customer.



References and Notes

- 1) Kader, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 627–654.
- 2) Douliez, J.P.; Michon, T.; Elmorjani, K.; Marion, D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer protein and indolines, the major lipid binding protein from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* **2000**, *32*, 1–20.
- 3) Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **1995**, *3*, 72–74.
- 4) Kader, J.C. Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci. Biol.* **1997**, *2*, 66–70.
- 5) Hinch, D.K. Cryoprotectin: A plant lipid-transfer protein homologue that stabilized membranes during freezing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2002**, *357*, 909–919.
- 6) Gaudet, D.; Laroche, A.; Frick, M.; Huel, R.; Puchalski, B. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiol. Plant* **2003**, *117*, 195–205.
- 7) Bubier, J.; Schlappi, M., Cold induction of *EARLI1*, a putative Arabidopsis lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ.* **2004**, *27*, 929–936.
- 8) Gorjanović, S.; Sužnjević, D.; Beljanski, M.; Ostojić, S.; Gorjanović, R.; Vrić, M.; Hranisavljević, J. Effects of lipid-transfer protein from malting barley grain on brewers yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* **2004**, *110*, 297–302.
- 9) Sohal, A.K.; Pallas, J.A.; Jenkins, G.I. The promoter of a *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and simulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *41*, 75–87.
- 10) Park, C.J.; Shin, R.; Park, J.M.; Lee, G.J.; You, J.S.; Paek, K.H. Induction of pepper cDNA encoding a lipid-transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 243–254.
- 11) Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–395.

- 12) Van Loon, L.; Van Strien, E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1999**, *55*, 85–97.
- 13) Sanchez-Monge, R.; Lombardero, M.; Garcia-Selles, F. J.; Barber, D.; Salcedo, G. Lipid-transfer proteins are relevant allergen in fruit allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *103*, 514–519.
- 14) Palacin, A.; Cumplido, J.; Figueroa, J.; Ahrazem, O.; Sanchez-Monge, R.; Carrillo, T.; Salcedo, G.; Blanco, C. Cabbage lipid transfer protein *Bra o 3* is major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 1423–1429.
- 15) Curioni, A.; Santucci, B.; Cristaudo, A.; Canistraci, C.; Pietravalle, M.; Simonato, B.; Giannattasio, M. Urticaria from beer: An immediate hypersensitivity reaction due to a 10 kDa protein derived from barley. *Clin. Exp. Allergy* **1999**, *29*, 407–413.
- 16) Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Robino, A.M.; Scibilia, J.; Fortunato, D.; Conti, A.; Borgonovo, L.; Bengtsson, A.; Ortolani, C. Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *114*, 908–914.
- 17) Hiller, K.M.; Lubahan, B.C.; Klapper, D.G. Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6, *Scand. J. Immunol.* **1998**, *48*, 26–36.
- 18) Charvolin, D.; Douliez, J.P.; Marion, D.; Cohen-Addad, C.; Pebay-Peyroula, E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipids at 2.1 Å resolution. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 562–568.
- 19) Lerche, M.H.; Poulsen, F.M. Solution structure of barley lipid transfer protein complexed with palmitate. Two different binding modes of palmitate in the homologous maize and different nonspecific lipid transfer protein. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2490–2498.
- 20) Salcedo, G.; Sanchez-Monge, R.; Diaz-Perales, A.; Garcia-Casado, G.; Barber, D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 1336–1341.
- 21) Salcedo, G.; Diaz-Perales, A.; Sanchez-Monge, R. Fruits allergy: Plant defence protein as noval potential panallergen. *Clin. Exp. Allergy* **1999**, *29*, 1158–1160.

- 22) Lindroff-Larsen, K.; Winther, J.R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett.* **2001**, *488*, 145–148.
- 23) Van Nierop, S.N.E.; Evans, D.E.; Axcel, B.C.; Cantrell, I.C.; Rautenbach, M. Impact of different wort boiling temperatures on the beer foam stabilizing properties of lipid transfer protein 1. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3120–3129.
- 24) Garcia-Casado, G.; Crespo, J.F.; Rodriguez, J.; Salcedo, G. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *108*, 647–649.
- 25) Quercia O; Zoccatelli, G; Stefanini, GF; Mistrello, G; Amato, S; Bolla, M; Emiliani, F; Asero, R. Allergy to beer in LTP-sensitized patients: Beers are not all the same. *Allergy* **2012**, *67*, 1186–1189.
- 26) Akiyama, H.; Imai, T.; Ebisawa, M. Japan food allergen labeling regulation—History and Evaluation. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Taylor, S., Ed.; Academic Press: Burlington, MA, USA, **2011**; Volume 62, pp. 139–171.
- 27) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
- 28) Van Paridon, P. A.; Gadella, T.W.J., Jr.; Wirtz, K.W.A. The effect of polyphosphoinositides and phosphatidic acid on the phosphatidylinositol transfer protein from bovine brain: Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *943*, 76–86.
- 29) Lusk, L.T.; Navarro, A.L.; Goldstein, H.; Wagner, R.J.; Ryder, D.S. Monoclonal antibodies for assaying lipid transfer proteins. U.S. Patent 6423546, 23 July 2002.
- 30) Hirose, J.; Kitabatake, N.; Kimura, A.; Narita, H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 2490–2497.
- 31) Hirose, J.; Murakami-Yamaguchi, Y.; Ikeda, M.; Kitabatake, N.; Narita, H. Oligoclonal enzyme-linked immunosorbent assay capable of determining the major food allergen, ovomucoid, irrespective of the degree of heat denaturation. *Cytotechnology* **2005**, *47*, 145–149.

- 32) Honjoh, T.; Muraoka, S.; Mamekoshi, S.; Sakai, M. Detection methods for allergic substances in foods by enzyme linked immune sorbent assay. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* **2002**, *206*, 13–22.
- 33) Murakami-Yamaguchi, Y.; Hirose, J.; Honjoh, T.; Narita, H. Evaluation of wheat content with monoclonal antibodies against lipid transfer protein. *J. Jpn. Soc. Food Ssi. Technol.* **2009**, *56*, 16–24.
- 34) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- 35) Kohler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497.
- 36) Nakane, P.K.; Kawaoi, A. Peroxidase-labelled antibody. New method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1084–1091.

第3章

Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いた

リンゴ使用量の評価系の確立

要約

食品中のリンゴ使用量の評価系を確立するために、リンゴ Lipid Transfer Protein(LTP)に対するモノクローナル抗体を作製した。得られた 5 抗体のうちの 2 抗体を用いてサンドイッチ ELISA を確立することに成功した。この定量系は LTP を 0.03~10 ng/ml で検出可能であり、スモモには交差するものの、特定原材料表示推奨品目に含まれる他の果物には交差せず、リンゴ LTP 特異的であった。リンゴを皮と可食部にわけて抽出し、この定量系で定量したところ、LTP は皮に局在していることが確認できた。また、リンゴジュースや野菜ジュース、カレールーなどの、リンゴ使用加工食品においても LTP を定量することができた。

はじめに

近年、アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害が増加している。これを予防するため、2002 年 4 月から食物アレルギーの発症数、重篤度などを考慮し、卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目が表示義務特定原材料として指定された（2008 年 6 月にえび、かにの 2 品目が追加指定）。2002 年 11 月には、厚生労働省からアレルギー物質を含む食品の検査法が通知され、定量検査法としては Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) が採用された（現在は消費者庁の所管となっている)¹⁾。実際の検査においては、ELISA 法により 10 µg/mL または 10 µg/g 以上の特定原材料タンパク質が検出された場合には、必要に応じて製造記録確認・確認検査等を行い、適正な表示となるよう措置がなされる。一方、特定原材料に準ずる 18 品目については、現在消費者庁を中心に定量法の確立プロジェクトが進行している。本研究はそのプロジェクトの一環として、表示推奨品目の中でも摂取頻度が高く加工品への利用が多いリンゴに対する免疫学的評価系の確立を目的として行った。

ターゲットタンパク質としては、Lipid Transfer Protein (LTP)を選択した。LTP は分子量約 9 kDa の分泌タンパク質で、分子内に存在する 8 つのシステイン残基はすべて S-S 結合を形成しており、安定な高次構造を持つため、加熱や消化酵素に対して耐性を示す²⁾。タンパク質としてのこのような特徴はアレルギー

ン性の高さに寄与している³⁾。また、LTPのアミノ酸配列はさまざまな植物で高い相同性をもっているため、LTPは汎アレルギーンとして知られている。本研究では上述の目的達成のために、他の果物に交差せず、リンゴLTP特異的に反応するモノクローナル抗体(mAb)を作製し、これを用いたリンゴLTPの定量系の確立を試みた。

試料と方法

1) リンゴLTPの精製

まず、Björksténらの方法を参考にリンゴ抽出液を作製した⁴⁾。具体的には、リンゴ(サンつがる) 3200g (13個)の種を除き、2 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、10 mmol/L ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム、3 mmol/L アジ化ナトリウムを含む抽出溶媒 3200 mL とポリビニルポリピロリドン 2%(w/v)を加えて粉碎し、攪拌機(Yamato LT400)により 4 °Cで一晩抽出を行った。その後、ガーゼろ過し、遠心分離(10,000×*g*, 4 °C, 10 分間)により上清を回収した。上清画分にトヨパール CM 樹脂(東ソー, TOYOPEARL CM 650M)を 20 mL 加え 4 °Cで一晩攪拌吸着させた後、遠心分離(10,000×*g*, 4°C, 10 分間)により樹脂を回収してカラムに詰め、20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 により樹脂を洗浄した。0.5 mol/L NaCl/20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 5 により吸着画分を溶出させた(CM 吸着画分)。その後、ゲルろ過クロマトグラフィー(Amersham Biosciences, Sephadex G-50, 内径 1.5×110 cm)により LTP 画分を得た。

タンパク質の定量は、牛血清アルブミン(SIGMA)を標準品として、DC プロテインアッセイ(BIO-RAD)を用い、655 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(Model 3550, BIO-RAD)、により測定した。

2) LTPの同定

精製の各段階において、まずは SDS-PAGE による解析を行った。ゲルは NuPAGE 10%Bis-Tris Gel (インビトロジェン)を用い、CROSSPOWER1000 (アトー) 80 mA の定電流、還元剤存在下において泳動した。ゲルはクマシーブリリアントブルーR-250 で染色した。

また、ゲルろ過の Peak③, Peak④についてはプロテインシーケンサー(Procise 491HT, アプライドバイオシステムズ)を用いて、N 末側の解析を行った。

3) mAb の作製

mAb の作製を初めとする免疫学的手法に関しては、基本的に Khöler G. と Milstein C. 及び森下と成田の方法に従った^{5) 6)}。

8 週令の雌 BALB/c マウスの腹腔内に抗原としてリンゴ LTP 画分 50 μ g と完全フロイントアジュバント (Freund's complete adjuvant, Difco) とのエマルション (1 容 : 1 容) を投与した。2, 4, 6 週間後, 上述抗原 20 μ g と不完全フロイントアジュバント (Freund's incomplete adjuvant, Difco) とのエマルション (1 容 : 1 容) を腹腔内に投与し, さらに 2 週間後抗原 10 μ g を含む PBS (150 mmol/L 塩化ナトリウムを含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7.4) を腹腔内に投与した。その 3 日後にマウスを屠殺し, 脾臓を摘出してこれをほぐし, 基本培地 (RPMI-1640 培地に 100 mmol/L ピルビン酸ナトリウム, 結晶ペニシリン G カリウム 1 万単位/L, ストレプトマイシン 10mg/L を加えた培地) に懸濁した後, 脾臓細胞を遠心分離で回収した。この脾臓細胞と 10% ウシ胎仔血清添加基本培地 (以下, 血清添加培地と記す) で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞 P3U1 を 10:1 の比率になるように混合し, 基本培地で 2 回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し, 細胞ペレットに平均分子量 1500 の 50% ポリエチレングリコール溶液 (Roche) 1 mL を 1 分かけて添加し, その後 1 分間静置した。さらに 20 mL の基本培地を 10 分間かけて添加して細胞液を希釈した後, 遠心分離により細胞を回収した。この細胞を 40 mL の HAT 培地 (4×10^{-7} mol/L アミノプテリン, 1.6×10^{-5} mol/L チミジン, および 1×10^{-4} mol/L ヒポキサンチンを含む血清添加培地) に懸濁し, 96 穴プレート 4 枚に分注し, 湿度 100%, 炭酸ガス 5%, 37 °C で培養を開始した。培養開始の翌日, HAT 培地を各ウェルに 100 μ L 添加し, 以後 2 ないし 3 日ごとに半量の培地を新たな HAT 培地と交換し, 培養を続けた。その結果, ほとんどのウェルでハイブリドーマの増殖が認められた。

細胞融合後, 得られたハイブリドーマから目的とする抗体産生細胞を選択するため, 固相 ELISA によりスクリーニングを行った。リンゴ LTP 画分を 2 μ g/mL で ELISA 用マイクロプレート表面に固相化後, 1% BSA/PBS によりブロッキングした。一次反応としてハイブリドーマ培養上清を反応させ, 続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (カップル) との反応後, p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムにより検出し, 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad) を用いて測定した。

スクリーニングで陽性を示した株については, 限界希釈法により 2 回のクローニングを行うことで mAb 産生細胞を樹立した。クローニング時には, 増殖培地として血清添加培地に増殖因子として ORIGEN (IGEN) を 10% になるように添加したものをを用いた。

樹立した mAb 産生細胞が培養上清中に分泌する mAb について、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウス mAb アイソタイピングキット (Amersham) を用いて調べた。

mAb を大量調製するために、マウスに腹水ガンを誘導した。まず、0.5 mL の 2,6,10,14-Tetramethylpentadecane(プリスタン,和光純薬工業)を BALB/c マウスの腹腔内に投与し、投与 3 ～10 日後に 1×10^7 個の mAb 産生細胞を腹腔内に移植した。その約 2 週間後に腹水を採取し、細胞を遠心分離後 ($10,000 \times g$, 4 °C, 5 分) 上清を回収し、プロテイン G セファロース (Amersham) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより mAb を純化した。さらに、抗体にペルオキシダーゼを直接標識することにより、酵素標識 mAb を作製した⁷⁾。

4) ウェスタン解析

モモ、キウイフルーツ、オレンジについてもリンゴと同様の方法で CM 吸着画分を作製した。各果物 CM 吸着画分 (タンパク質として 5 µg) の SDS-PAGE を行った後、ゲル上のタンパク質をポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (BIO-RAD) に転写し、5%スキムミルクを含む PBS によるブロッキングを室温で 1 時間行った。その後、抗リンゴ LTP mAb (ハイブリドーマ培養上清) と室温、1 時間で反応させた。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (American Qualex) で室温、1 時間の反応を行い、発色はアルカリフォスファターゼ発色キット (ナカライテスク) により行った。

5) サンドイッチ ELISA

ELISA 用 96 穴マイクロプレート (NUNC) に 5 µg/mL 抗リンゴ LTP mAb を 50 µL 添加し、37°C で 1 時間放置後、1%BSA/PBS によりブロッキングした。続いて、リンゴ LTP (0～100 ng/mL) または試料溶液を 50 µL ずつ添加し、37 °C で 1 時間放置した。その後、ペルオキシダーゼ標識抗リンゴ LTP mAb を 50 µL ずつ添加し、37 °C で 1 時間放置し、テトラメチルベンジジンを基質として検出し、反応停止液 (1 mol/L 硫酸) 添加後、主波長 450 nm、副波長 655 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

6) LTP 定量用抽出液の調製

生の果物 (リンゴ、オレンジ、バナナ、キウイフルーツ、モモ、スモモ、ナシ) は、褐変を防ぐ目的で、リンゴ LTP 精製時に用いた抽出溶媒をサンプルと同重量加えて粉碎し、一晚抽出を行った。これを 2 倍希釈抽出液とした。カレールーは、ホモジナイザーで均質化した後 1 g を量りとり、PBS 19 mL を混合

して一晩振とう抽出を行った。これを 20 倍希釈抽出液とした。各抽出液を遠心分離 ($3,000 \times g$, 4 °C, 20 分間) して上清を回収し、ろ過 (No.2, Advantec) したろ液を試料溶液とした。ジュースはそのまま試料溶液とした。なお、皮と可食部に分けた定量では、リンゴを食べるときの下処理と同様に包丁でむいた皮と、皮と芯を除いた可食部をそれぞれサンプルとした。

結果および考察

1) 精製リンゴ LTP の評価

生リンゴから抽出を行い、最終的にゲルろ過クロマトグラフィーで分取した画分 (図 1-1) を SDS-PAGE に供した結果、Peak③に分子量 9 kDa 付近の単一タンパク質、Peak④にそれより少し小さい単一タンパク質の 2 種類を確認した (図 1-2)。Peak③の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、IT(X)GGVTSSLAP(X)IGYVRSG なる配列が得られた。これは Sánchez-Monge らが報告しているリンゴ LTP の N 末端アミノ酸配列と一致したため、この画分がリンゴ LTP であると同定した⁸⁾。一方 Peak④の N 末端アミノ酸配列として GSPFQDSK(X)GVR(X)SKAGYK という配列が得られたので、ホモロジー検索を行った結果、Segur らが報告しているジャガイモ snakin-1 と高い相同性を示した⁹⁾。snakin-1 はジベレリンにより発現が制御されているタンパク質で、微生物に対する抵抗性をもつことが報告されているが、高次構造や生理機能については不明である⁹⁾。

2) 抗リンゴ LTP mAb の果物間における交差反応性

3 匹の免疫マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合後、最終的に 5 個 (1G, 7D, 11G, 12E, 12H) の mAb 産生ハイブリドーマを樹立した。いずれの mAb も IgG1κ であった。これらの細胞をプリスタン処理したマウスに接種することで腹水ガンを誘導し、採取した腹水からプロテイン G により IgG 画分を回収した。得られた精製抗体の表示推奨品目に含まれる果物間における交差反応性を検討した。リンゴ、モモ、キウイフルーツ、オレンジの CM 吸着画分をタンパク質として 5 μg 用いて SDS-PAGE を行った結果、いずれの果物でも 9 kDa 付近にタンパク質のバンドが認められた (図 2A)。ウェスタン解析の結果では、得られた抗体はすべてリンゴ LTP に強く反応を示したが、7D についてはモモに対しても若干交差した (図 2 B~F)。なお、バナナも表示推奨品目に含まれているが、CM 吸着画分を得られなかったためサンプル化できなかった。バナナ LTP のアミノ酸配列は、他の果物の LTP と比べてかなり違うので交差する可能性は低いと考えられた。事実、後述のサンドイッチ ELISA でもバナナには交差しなかった。

3) サンドイッチ ELISA の構築

5 種類の純化した抗体とそれぞれの酵素標識抗体を用いて、リンゴ LTP に対するサンドイッチ ELISA の組み合わせを検討した結果、2 通りの ELISA 系が成立したが、固相：12H，標識抗体：7D の組み合わせの方が感度が高く，検出範囲は 0.03~10 ng/mL であった（図 3）。

まず，本定量系の果物間における交差反応性を検証した（表 1）。アレルゲン表示推奨果物に対しては交差しなかった。酵素標識抗体として用いている 7D は，ウェスタンブロッティングではモモへの交差がみられたが，リンゴ特異的でモモに交差しない 12E を固相抗体とすることで，7D の特異性の甘さを無視できるサンドイッチ ELISA を構築できた。リンゴと同じバラ科果物に属するスモモに対しては交差性が認められたが，アレルゲン表示対象外であること，加工品としての使用が稀であることから，許容できるものとする。なお，当然のことではあるが，本定量系はアレルゲン表示義務化特定原材料の 7 品目とは反応しなかった。

次に，品種の違う種々のリンゴ LTP の定量を試みた（表 2）。現在市場で販売されている品種は古種を掛け合わせた新種で多く占められており，消費者の嗜好や害虫対策のために品種改良が繰り返されている。紅玉，千秋，旭，スターキングは古種であり，ジョナゴールド，アルプス乙女，シナノスイートは古種を掛け合わせた新種と呼ばれる品種である。LTP 含量を比較すると各品種間では 10 倍異なるものもあったが，古種と新種による差はほとんどみられなかった。食品成分表に表記されているリンゴのタンパク質量は 0.2%（アミノ酸組成によるタンパク質量では 0.1%）であり，濃度に換算すると 1~2 mg/g である。リンゴ果実の LTP 定量結果を約 10 µg/g とすると，リンゴタンパク質の 1/100~1/200 程度を LTP が占めると考えられる。アレルゲン表示においては，タンパク質量として 10 µg/g 以上使用されているかどうかを評価する必要があるが，LTP 量として 0.1 ng/mL から定量できる本定量系では，リンゴタンパク質量に換算しても 10 ng/g 程度から検出することができるので，十分な感度を得られたと考えている。

リンゴは，完熟後保存期間が長くなると LTP の減少がみられると報告されている¹⁰⁾。本実験のサンプルとして用いたリンゴが収穫後どれくらいの時間を経過しているかは不明であるため，LTP 含量を比較することは難しい。また追熟ホルモンであるエチレンの増加により LTP が増加すること，エチレン生成量は品種間で大きな差があることから，植物ホルモンとの関連も興味を持たれるところである^{11) 12)}。

その他，リンゴを含むとの表示のあるジュースやカレールウは製造中に加熱工程があるにも拘わらず LTP の定量が可能であった。果物は生の状態で摂取す

ることが多いが、ジャムやケーキなど加熱加工食品にも広く使用されている。果物の主要アレルゲンである PR-10 に属するタンパク質やプロフィリンは加熱するとアレルゲン性が劇的に低下すると言われている¹³⁾。しかし、LTP は 180 °C の高温加熱処理を行ってもアレルゲン性を維持していること、またリンゴ LTP が加熱によりリンゴ中の糖類と結合して糖化され、アレルゲン性が保持されていると報告されていることから、LTP は果物加工食品の中で追跡するのに適したアレルゲンタンパク質であるといえよう^{14) 15)}。

また、LTP は植物の表層で生体防御タンパク質として働いていると考えられている。そこで果実にとっての表層である皮と可食部にわけてそれぞれ抽出し、LTP 量を定量してみたところ、皮に局在していることが分かった (表 3)。リンゴの加工品には、ジュース、缶詰、ジャムなどがあり、加工品用のリンゴの約 90 % がジュース用である。リンゴジュースは、除芯後皮付きのままクラッシャーで破碎され、搾汁機にかけられ原果汁にされる。LTP は水で抽出されやすいタンパク質であるため、ジュースなど皮ごと加工されるものに関しては検知できると考えられる。しかし、皮を除いてから加工するものに関しては、LTP 定量の結果から実際のリンゴの使用量を適正に評価できない可能性がある。また、植物は栽培条件によって個体差が大きい可能性が考えられるため、数多くのサンプルを定量し、今回確立したリンゴ LTP の評価系がアレルゲン表示におけるリンゴ使用量の評価に適しているかどうか、さらなる検証をしていきたいと考えている。

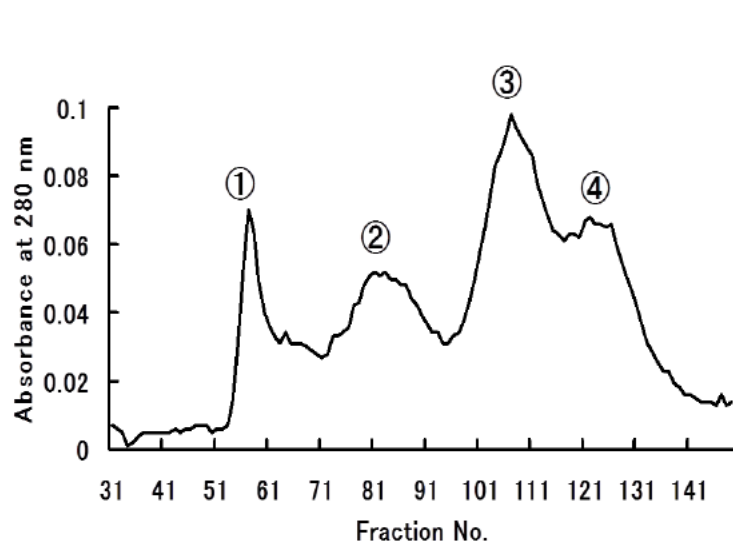


図 1-1

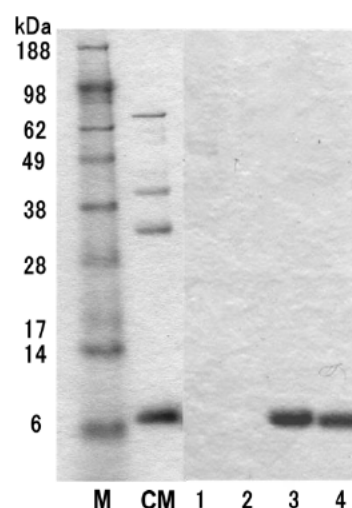


図 1-2

図 1-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる LTP の分離

リンゴ CM 吸着画分を、セファデックス G50 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにかけ、LTP の精製を行った。

図 1-2. ゲルろ過による各ピークの解析

ゲルろ過の 4 つの各ピークに対し、10%均一ゲルを用いて還元状態における SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。

M: 分子量マーカー, CM: リンゴ CM 吸着画分 (5 μ g/lane), 1: ピーク① (2 μ g/lane), 2: ピーク② (2 μ g/lane), 3: ピーク③ (2 μ g/lane), 4: ピーク④ (2 μ g/lane)

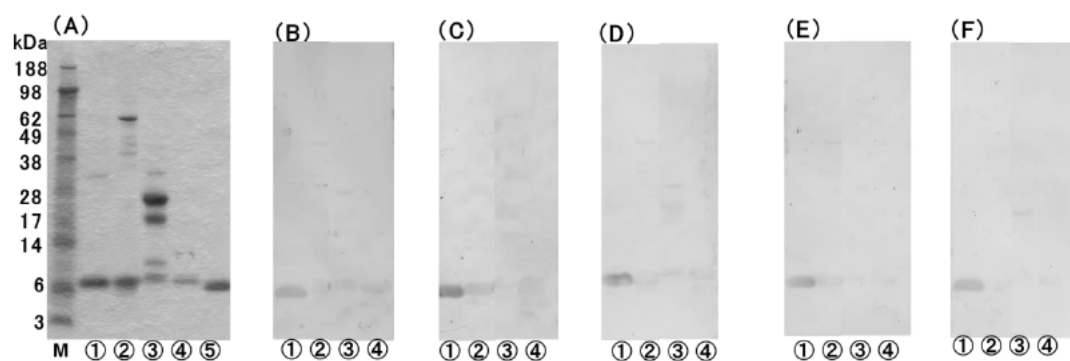


図 2. モノクローナル抗体の果物間における交差反応性

(A): 各果物の CM 吸着画分に対し、10%均一ゲルを用いて還元状態における SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。(B) ~ (F): これを mAb 1D (B), 7D (C), 11G (D), 12E (E), 12H (F) を用いてウェスタン解析を行った。

M: 分子量マーカー, ①: リンゴ, ②: モモ, ③: キウイフルーツ, ④: オレンジ 各 CM 吸着画分 (5 μ g/lane), ⑤: リンゴ LTP (3 μ g/lane)

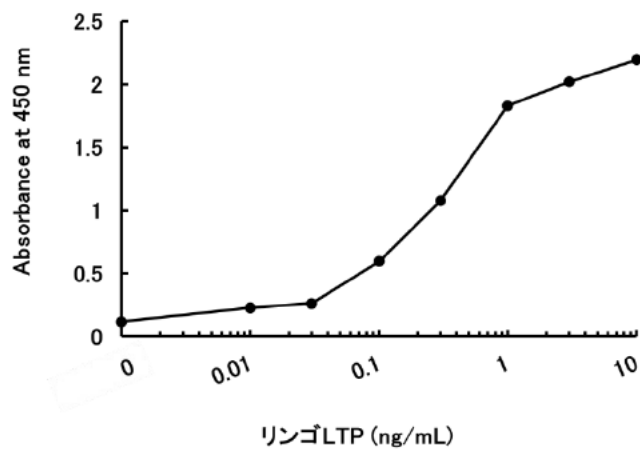


図 3.リンゴ LTP に対するサンドイッチ ELISA の標準曲線

固相抗体：12H，ペルオキシダーゼ標識抗体：7D の組み合わせにおいて，リンゴ LTP に対する検量線を作成した。

		LTP (μ g/g)
表示推奨果物	リンゴ	10.79
	オレンジ	—
	バナナ	—
	キウイフルーツ	—
	モモ	—
バラ科果物	スモモ	4.27
	ナシ	—

—：検出限界以下

表 1.抗リンゴ LTP サンドイッチ ELISA の果物間の交差反応性

サンドイッチ ELISA の果物間の交差反応性を，各果物中の LTP を定量し果物 1 g 当たりの LTP 量を調べることで確認した。リンゴはジョナゴールドを用いた。

食品名		LTP ($\mu\text{g/g}$, ml)
古種	紅玉	8.41
	千秋	14.21
	旭	3.99
	スターキング	10.11
新種	ジョナゴールド	9.27
	アルプス乙女	31.21
	シナノスイート	15.02
	100%リンゴジュース(ふじ)	2.52
	野菜ジュース	0.12
	カレールウ	0.01

表 2 食品中のリンゴ LTP

異なる品種のリンゴ及びリンゴ使用表示のある加工食品中の LTP 含量をサンドイッチ ELISA で定量し，食品 1g あるいは 1ml 当たりの LTP 量で示した。

品種	LTP ($\mu\text{g/g}$)	
	皮	可食部
ジョナゴールド	20.18	0.04
陽光	12.47	0.03
北斗	10.83	-
サンふじ	4.99	0.02
王林	10.08	-

- : 検出限界以下

表 3 部位別リンゴ LTP の定量

リンゴを皮と可食部に分けて抽出し，それぞれの LTP 含量をサンドイッチ ELISA で定量し，皮，可食部それぞれ 1g 当たりの LTP 量で示した。

References

- 1) 消費者庁次長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について
(平成 22 年 9 月 10 日 消食表第 286 号)
- 2) Kader J. C.: *Plant Mol. Biol.*, **47**, 627-654 (1996)
- 3) Kondo Y. and Urisu A.: *Allergol. Int.*, **58**, 485-91 (2009)
- 4) Björkstén F., Halmepuro L., Hannuksela M., Lahti A.: *Allergy*, **35**, 671-677(1980)
- 5) Khöler G. and Milstein C.: *Nature*, **256**, 495-497 (1975)
- 6) 森下恵美, 成田宏史：本誌, **47**, 1-18 (1992)
- 7) Nakane PK, Kawaoi A.: *J. Histochem Cytochem.*, **22**, 1084-91(1974)
- 8) Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G: *J. Allergy Clin Immunol.* **103**, 514-519 (1999).
- 9) Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**:16-23(1999)
- 10) Sancho AI, Foxall R, Rigby NM, Browne T, Zuidmeer L, van Ree R, Waldron KW, Mills EN.: *J. Agric Food Chem.* **54**, 5098-5104 (2006)
- 11) Jung HW, Kim W, Hwang BK.: *Plant Cell Environ.*, **26**, 915-928 (2003)
- 12) Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T and Niizeki M.: *TheorAppl Genet*, **101**, 742-746 (2000)
- 13) Kondo Y. and Urisu A.: *Allergol. Int.*, **58**, 485-91 (2009)
- 14) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P.: *J. Allergy Clin Immunol.*, **112**, 1009-1011 (2003)
- 15) Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S: *Allergy*, **60**, 1262-1268 (2005)

第 4 章

Gibberellin Regulated Protein は

モモアレルギーにおける全身性反応のマーカーアレルゲンである

要旨

日本のモモアレルギー患者では、欧州の重症マーカーである Lipid Transfer Protein (LTP) に対する ImmunoCAP(CAP)が陽性になることはまれである。我々は、LTP に対する免疫学的評価系の確立を目指す中で Gibberellin Regulated Protein (GRP)を見出したので、そのアレルゲン性を検討した。まず、LTP, GRP に対するモノクローナル抗体を用いて抗体カラムを作製し、モモ果実から LTP, GRP を純化した。この純化抗原を用い、30 名のモモアレルギー患者（男性:女性=11:19, 平均年齢 32.3 歳）に対して、ELISA, イムノブロット, プリックテストを実施した。あわせて、モモの主要アレルゲン 3 種類 (Pru p 1,2,3) については CAP を行った。全身症状を経験した重症群14名と口腔咽頭症状のみの軽症群 16名の 2 グループに分けて解析したところ、CAPでの rPru p 1, Pru p 3 (LTP), Pru p 4 に対する陽性率は、重症群ではそれぞれ 28.6%, 7.1%, 0%, 軽症群では 68.7%, 0%, 56.2%であった。GRP 陽性者は ELISA では重症群 7 例, 軽症群 1 例, イムノブロットでは重症群 7 例, 軽症群 0 例, プリックテストでは重症例 4/5 例, 軽症例 0/6 例であった。一方、LTP に陽性を示す者はわずかであり、その反応性も低かった。モモ LTP は皮に局在しているが GRP は果肉に多い傾向がある。モモを食べる際に皮をむくことが多い日本人においては、皮に局在する LTP よりも GRP の方がアレルギーの重症マーカーとして適切であることが示された。なお GRP と同じたんぱく質が Tuppera によって、2013 年に初めて発表され、Peamaclein (Pru p 7) としてアレルゲン登録された。

はじめに

モモは、欧州と同様に日本においても植物性の食物アレルゲンとして重要である。今日まで、ほとんどのモモアレルギーは以下の 3 つのうちのどれかに分類されてきた¹⁾。①カバノキ花粉に感作されたのちに、Bet v 1 と相同性の高いモモアレルゲン Pru p 1 に交差反応するもの²⁾。②さまざまな花粉に保存されており、パンアレルゲンとして知られているプロフィリンによって感作され、モモのプロフィリンである Pru p 4 に反応するもの^{3,4)}。③特に地中海地方に多いが Pru p 3 (LTP)に感作されているもの⁵⁾。これら 3 抗原のうち、LTP がアレルゲン

である場合に症状が重篤であることが多いため、ヨーロッパでは LTP はモモアレルギーの重症マーカーとされている。しかし日本では、モモ摂取により全身症状をおこした患者のほとんどが、ImmunoCAP による特異的 IgE の検査で rPru p 3 に陽性を示さない⁶⁾。その理由として、食べているモモの品種の違いや、人種の違いによるアレルギーへの反応性の違い、または、先にあげた 3 抗原以外の抗原への感作が考えられる。

我々は、LTP に対する研究を進める過程で、Gibberellin Regulated Protein (GRP) を見出した。GRP は、発見当初はジャガイモの抗菌ペプチドとしての報告があるくらいで他に情報がなかったが、塩基性の低分子たんぱく質で、アミノ酸 63 個中 12 個がシステインという特徴的なたんぱく質である^{7,8)}。GRP のたんぱく質としての性質が LTP と非常によく似ていることから新規アレルギーである可能性が考えられたので、そのアレルギー性の解析を行った。このモモ GRP については、2012 年に Tuppo らが、同じたんぱく質を Peamaclein と命名し、新規モモアレルギー Pru p 7 として報告した⁹⁾。本研究では、日本のモモアレルギー患者において、臨床症状の重さと GRP、LTP の感作状況を比較、検討した。

方法

1) 患者

2001 年～2010 年の間に、モモアレルギーと診断され、横浜市立大学医学部付属病院皮膚科に通院している患者を被験者とした。モモ単独摂取後 30 分以内にアレルギー症状が現れた患者がプリックテストで陽性であったか、ImmunoCAP(Phadia, Uppsala, Sweden)で検査したモモ特異的 IgE の値が陽性であったか、経口負荷試験においてモモで陽性であった場合に、モモアレルギーであると診断した。本研究は、施設内倫理委員会の承認を得ている。また、すべての患者に同意を得ている。

2) モモ粗抽出液の調製

市販のモモ（浅間白桃）の種を除いた果肉と皮を抽出溶媒（2 mmol/L disodium ethylenediamine tetraacetate, 10 mmol/L sodium N, N-diethyl dithiocarbamate, 3 mmol/L sodium azide, and 2% suspended solid polyvinyl polypyrrolidone at a 1:1 [w:v] ratio）とともに粉砕し、ガーゼでこした後に遠心した（10,000g, 15min, 4°C）¹⁰⁾。遠心上清に陽イオン交換樹脂（Toyopearl CM 650M, TOSO, Tokyo, Japan），を加えて 4°Cで一晩吸着させた。樹脂を回収し、カラムにつめ、20 mmol/L リン酸緩衝液（pH 5.0）にて洗浄した。樹脂に吸着したたんぱく質は 0.5 mol/L NaCl を含む 20 mmol/L リン酸緩衝液（pH 5.0）にて溶出し、モモ粗抽出液とした。たんぱく質濃度は DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Bradford,

UK)にて定量した。また、モモ粗抽出液の一部はプリックテスト用にポアサイズ 0.22 μ m のフィルター(Millipore, Bedford, MA, USA)でろ過したのち、使用するまで-80℃にて保存した。

3) SDS-PAGE と IgE イムノブロットによる解析

モモの粗抽出液，または精製抗原は還元状態あるいは非還元状態で MiniProtean-3 (BioRad, Hercules, CA, USA)を用い，Laemmli.らの方法で SDS-PAGE(15% [w:v], 10 μ g per slot)を行った¹¹⁾。還元状態の SDS-PAGE では，サンプルを 0.1M Tris, pH 6.8, containing 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 10% (w/v) 2-mercaptoethanol and 0.02% (w/v) bromophenol blue に溶解し，100℃，5 分で変性させた。タンパク染色には Coomassie Brilliant Blue R-350 (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA)を用いた。

非還元状態の SDS-PAGE を行ったゲル上のたんぱく質を，Immobilon-P PVDF membrane (Millipore)にセミドライ方式で転写した。そのメンブレンを，150 mmol/L 塩化ナトリウムを含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7.4 (PBS) に 5% スキムミルク，0.1% Tween20 を加えたものでブロッキングした。1 次抗体には，ブロッキング液で 20 倍希釈した患者血清を使用し，2 次抗体には HRP 標識抗ヒト IgE (KPL, Washington, U.S.)を用いた。ECL Western blotting detection kit (GE Healthcare)を用いて検出し X-ray film (Hyperfilm MP, GE Healthcare)で現像した。

4) GRP と LTP の純化

GRP と LTP に対するモノクローナル抗体(mAb)を得るために，定法にしたがってハイブリドーマを樹立した^{12) 13)}。8 週齢のメスの Balb/c マウス(Nippon SLC Co., Shizuoka, Japan)に，1 匹あたりのたんぱく質量が 50 μ g になるように調整したモモ粗抽出液とフロイント完全アジュバントのエマルジョンを腹腔に免疫した。2 週間後に同抗原 20 μ g とフロイント不完全アジュバントのエマルジョンを腹腔に追加免疫し，さらに 2 週間後に同抗原10 μ g の PBS 溶液を腹腔に免疫した。免疫抗原に反応する IgG を産生するハイブリドーマを限界希釈法にて 2 回クローニングし，プリスタン処理により腹水ガン化を誘導したマウスの腹腔に接種した。得られた腹水から Protein G-Sepharose columns (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA)を用いて mAb を純化した。GRP, LTP 特異的 mAb の選択は，モモ粗抽出液の非還元ウェスタンブロットにより行った。

なお，動物実験は，「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）」に基づき，京都女子大学・京都女子大学短期大学部動物実験規定にしたがって行った。

HiTrap NHS-activated HP Column (GE Healthcare)に GRP, LTP それぞれに対す

る mAb を結合させた抗体カラムを作製した。モモ粗抽出液から、それぞれの抗体カラムを用いて、GRP, LTP を純化した。純化した抗原は、N 末端アミノ酸配列解析により確認した。

5) N 末端アミノ酸配列解析

非還元状態での SDS-PAGE を行った後、たんぱく質を PVDF 膜に転写し、クーマジーブリリアントブルーで染色した。9kDa 付近のバンドと 14kDa 付近のバンドを切り出し、476A gas-phase protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、N 末端側アミノ酸配列の解析を行い、得られた配列を Phytozome と NCBI のサイトで BLAST 検索し、同定した。

6) ImmunoCAP と ELISA による特異的 IgE の測定

ELISA は既報を改良して行った¹²⁾。96 穴マイクロプレート (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) の各ウェルに 10 µg/ml のモモ粗抽出液, 2 µg/ml の GRP, LTP をそれぞれ 50µl ずつ入れ, 4°C で 1 晩放置し, 固相化後, 200µl の 1%BSA でブロッキングした。1 次抗体として, 0.1% BSA, 0.02% Tween 20, 0.15M NaCl, and 10mM Tris-HCl pH 7.4 (TBS-T) で 10 倍希釈したヒト血清 50µl を各ウェルに入れ, 37°C, 1 時間反応させた。TBS-T にて洗浄後, 50µl のアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgE (American Qualex, San Clemente, CA, USA)を加え, 37°C で 1 時間反応させた。洗浄後, 基質として 100µl の p-ニトロフェニルリン酸を 1mg/mL 含むジエタノールアミン緩衝液 (10%ジエタノールアミン, 0.5 mmol/L MgCl₂, pH 9.8)を加え, 37°C, 1 時間反応させたのち, 主波長 405 nm, 副波長 655 nm における吸光度の差をマイクロプレートリーダーにより測定した。また, 3 名の健常人血清をネガティブコントロールとして使った。特異的 IgE の陽性の基準は, 健常人血清が示した 405nm の吸光度の値の平均に 10 倍の標準偏差を足した値とした。したがって, モモ粗抽出液, GRP, LTP それぞれの基準値は 0.12, 0.08, 0.07 となった。すべての試験は 3 回ずつ行った。

血清総 IgE, と rPru p 1, rPru p 3, rPru p 4 に対する特異的 IgE の値は ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)を用いてはかり, 0.7 kUA/L (class 2) 以上を陽性とした。

7) プリックテスト

プリックテストには, モモ粗抽出液(100µg/mL in PBS), GRP(100µg/mL in PBS), LTP (100µg/mL in PBS)の 3 抗原を用い, 定法にしたがって行った¹⁴⁾。また, 生のモモ果実を用いたプリック-プリックテストも併せて行った¹⁵⁾。ヒスタミン塩酸塩 (10mg/mL) をポジティブコントロールに, 生理食塩水をネガティブコントロールに用いた。膨疹の直径がネガティブコントロールと同じときは陰性,

ポジティブコントロールの直径の半分以上の場合は陽性と診断した。それぞれの抗原について、5名の健常人でもプリックテストを実施した。

8) 統計処理

モモアレルギーの臨床症状と感作抗原の関係性はフィッシャーの正確確率検定により解析し、 $p < 0.05$ のであれば有意に関連があると判定した。

結果

1) モモアレルギー患者の臨床症状

モモを食べた後の症状によって、2臓器以上にアレルギー症状がでた重症群（男7名、女7名；18歳 - 60歳；平均年齢32.0歳；患者番号1 - 14）と、症状が口腔咽頭のみにとどまった軽症群（男4名、女12名；7 - 55歳；平均年齢32.3歳；患者番号15 - 30）の2つのグループに分けた（表1）。

それぞれの患者の、モモ摂取後の症状については表1にまとめた。特に、患者番号1 - 4の4名は、アナフィラキシーショックを経験していた。バラ科果物のアレルゲンは、交差反応することが多く、重症群では12/14（85.7%）、軽症群では14/16（87.5%）がモモ以外のバラ科果物でもアレルギー症状を経験していた。軽症群の場合は、モモ摂取時とモモ以外のバラ科果物摂取時の症状はほとんど同じであった。しかし、重症群では、梅摂取時には、モモ摂取時と同様の重篤な症状を引き起こしたが、他のバラ科果物では症状が軽く、口腔咽頭症状もしくは皮膚症状のみにとどまった。

2) GRP と LTP の同定

還元状態のモモ粗抽出液を SDS-PAGE にかけてときにみられた 9kDa 付近の LTP と思われるバンドが、非還元状態では、9kDa 付近と 14kDa 付近の2本のバンドに分かれた（図1）。この2つのたんぱく質を同定するために N 末端アミノ酸配列を解析し、UniprotKB によりホモロジー検索を行った。その結果、非還元状態で 9kDa に現れたバンドの N 末端は GSXFXDSKXGVRHSKAGYTE であり、2012 年 10 月に WHO-IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee に登録された Peamaclein (accession number: P86888) に相当した（図2）。14kDa のバンドの N 末端は ITXGQVSSXLAPPIPVVPG であり、LTP (accession number: P81402) であることが明らかになった。抗体カラムにより精製した純化 GRP、LTP から、それぞれ同じ配列が確認できた。

3) IgE イムノブロットと阻害ブロット

図3で示すように、IgE イムノブロットでは患者番号3番を除く29名のうち、各抗原に反応したのは、モモ粗抽出液21名(72.4%)、GRP7名(24.1%)、LTP0名(0%)であった。健常人血清は、すべての抗原に反応しなかった。また、GRPに反応した患者7名のうち重症群に属する患者が6名(1, 5, 6, 7, 9, 12, 46.2%)であり、軽症群に属するものは1名(17, 6.3%)であった。したがって、重症症状とIgE イムノブロット陽性の間には関連があった($p<0.05$)。

続いて、阻害ブロットを行った(図4)。血清は6番と12番を用いた。その結果、モモ粗抽出液中のGRPに相当するバンドと、純化GRPのバンドが、阻害ありでは完全に消え、血清中IgEが、明らかにGRPに反応していることが確認できた。

4) ImmunoCAP と ELISA による特異的 IgE の測定

ImmunoCAPで測定した総IgEは、48–1994 IU/mL(平均:490.5, 基準値: 1–300)であった(表2)。モモ特異的IgEは重症群(6/14, 42.8%)の方が軽症群(13/16, 81.3%)よりも低かった。

図5に示すように、特異的IgEのアレルゲンコンポーネントに対する反応性は重症群と軽症群でパターンが明らかに異なる。花粉抗原と交差性のあるrPru p 1 and rPru p 4に対する陽性率は軽症群(68.7% , 56.2%)の方が重症群(28.6%, 0%)より高かった。軽症群のrPru 1への感作率には有意な関係はみられなかったが($p=0.07$)、rPru 4への感作率は有意であった($p<0.05$)。また、rPru p 1, rPru p 4に対する特異的IgEの反応性はrBet v 1とrBet v 2に対する反応性とよく似ていた(表2)。rPru p 3に対して陽性であったのは8番だけであり、しかも、かなり低い値であった。

一方、ELISAにおいてGRPに陽性であったのは、重症群で64.3%(9/14)、軽症群で12.6%(2/16)となった。一方、LTPへの感作率は重症群で14.3%(2/14)、軽症群で0%(0/0)であり、陽性2名もかなり低い値であった。重症群のGRPへの感作率は有意に関係があったが($p<0.01$) LTPではなかった($p=0.21$)。加えて、アナフィラキシーショックを経験した患者4名中3名がGRPに感作していた。以上の結果より、LTPではなく、GRPへの感作と症状の重篤さに強い関係があるといえる。

5) プリックテスト

患者に十分説明したうえで、重症群、軽症群、5名ずつの患者に対してプリックテストを実施した。全ての患者が、生のモモ果肉に対して陽性を示した。このうち2名の患者は皮に対しても陽性となったが果肉よりも反応は弱かった。

また、モモ粗抽出液、GRP, LTP に陽性を示したのは、重症群ではそれぞれ 80% (4/5), 80% (4/5), 40% (2/5), 軽症群では 40% (2/5), 0% (0/0), 0% (0/0) であった。これより、重症症状と GRP 陽性反応には強い関連がみられた ($p<0.05$) が、LTP には見られなかった ($p=0.44$)。

考察

以上の結果から、我々は、日本人モモアレルギー患者における新たなアレルゲンとして GRP を同定した。また、日本においては、これまでヨーロッパで重篤なモモアレルギーを引き起こす抗原とされてきた LTP よりも、GRP の方が、症状の重篤さと関係が深いということを明らかにした。

GRP はイタリアの Tuppo らのグループによって 2013 年に初めて発表され、Peamaclein (Pru p 7) としてアレルゲン登録された⁹⁾。GRP は 63 アミノ酸からなる約 7kDa の塩基性たんぱく質である。さらに 12 個ものシステイン残基をもっており、分子内で 6 対の S-S 結合を形成していると考えられている。生理機能については、あまり明らかになっていないが、ジャガイモの抗菌ペプチドであるという報告がある⁴⁾⁵⁾。LTP も分子量 9kDa の塩基性たんぱく質であり、生体防御タンパク質として PR-14 に登録されている。つまり、GRP は LTP のように熱安定性が高く、消化酵素への抵抗性も高いと考えられる¹⁶⁾¹⁷⁾。それゆえに、GRP も LTP 同様、腸管から感作され食物アレルギーを引き起こすと予想される。このように、LTP と GRP のたんぱく質としての性質は非常によく似ている。したがって、モモの中の LTP と GRP を完全に分離することは難しく、通常のクロマトグラフィーや HPLC、還元状態の電気泳動ではほとんど分かれなない。これまで、モモから精製した LTP を診断に使い、LTP がアレルゲンであると考えられた症例の中に、GRP が原因である症例があった可能性が高い。しかし、性質は似ていても一次構造は全く異なるので、LTP, GRP それぞれに対するモノクローナル抗体は互いに全く交差反応しない。そこで我々は、モノクローナル抗体を用いてカラム作製することで、簡便に、非常に純度の高い LTP, GRP を精製することに成功した。

LTP は植物の表層に分布していることが知られている。モモ果実においては皮に局在していることがわかっているため、皮をむいた果肉の摂取では症状が抑えられる^{18) -22)}。一方、我々は、GRP が皮と果肉両方に存在することを確認している (結果省略)。

これまで述べてきたように、イムノブロット、ELISA、プリックテストで調べた GRP の感作率とアレルギー症状が重篤であることの間には明らかな関連が認められた。LTP は皮に局在しているが、GRP は皮と果肉両方に分布している。Tuppo らの報告では、イタリアのモモアレルギー患者のアレルゲンとして、LTP

単独，GRP 単独，LTP・GRP 両方，またはそれ以外の抗原があげられている⁹⁾。欧米ではモモを皮ごと食べることが多いため，GRP だけでなく LTP にも感作していることが多いと考えられる。一方，日本ではモモを食べるときに皮をむくことが多いので，自然と LTP を除去できている。それゆえに LTP への感作がまれであり，重症者の多くが GRP に感作されていたと考えられる。以上のことより我々は，日本のように皮をむいたモモを食べる地域では，LTP よりも GRP の方がモモアレルギーの重症マーカーとして適切であると結論付けた。

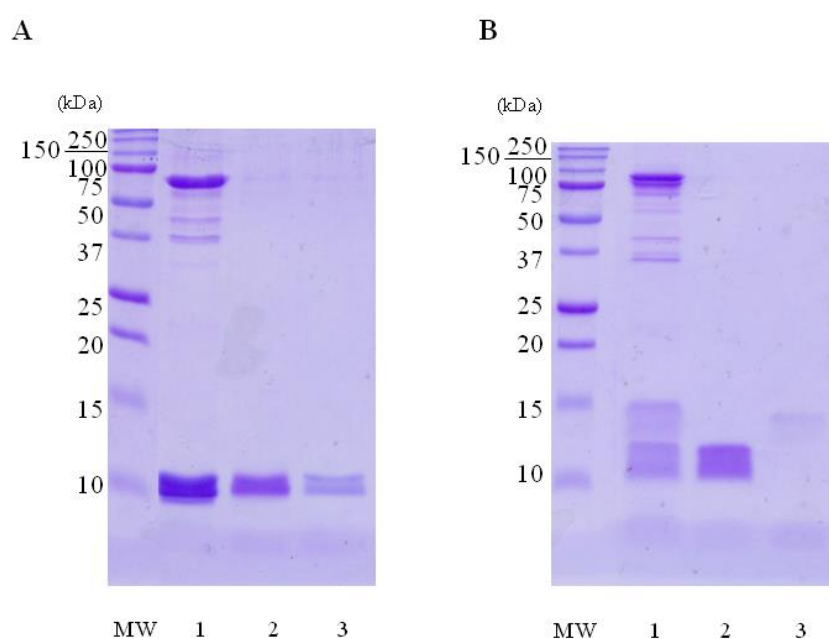


Fig. 1. SDS-PAGE under reducing conditions (A) and non-reducing conditions (B). Separation of crude extract (lane 1), purified Peamaclein (lane 2) and LTP (lane 3) from peaches. MW, Molecular weight marker (in kDa).

Source	Uniprot KB accession No.	Allergen name	Amino acid sequence								% identity
			1	10	20	30	40	50	60		
Peach	P66888	Peamaclein	<u>GSSFCDSKCGVRC</u> SKAGYQERCLKYCGICCEKCHCVPSGTYGNKDE <u>CC</u> PYRDLKNSKGNPKCP								-
Black cotton	B9MVT8	Not registered	A-G	-S-	-IKD-	-K-	-H-	-M-	-K-		84
Potato	Q948Z4	Not registered	-	-KL-	-LAD-	-E-K-	-H-	-K-	-KS-		82
Caster bean	B9R733	Not registered	-G-	-EK-	-E-VKD-	-K-	-H-	-M-	-K-		82
Grape	E0CP56	Not registered	-	-AA-	-MKD-	-E-K-	-H-	-K-K-	-Q-		82
Soybean	C6SY10	Not registered	-P-	-AQ-	-A-V-D-	-RF-	-N-	-M-	-KD-		81

Fig. 2. Alignment of full amino acid sequences of Peamaclein and its homologues from other plants.

The N-terminal underlined sequences were confirmed by protein sequencing of the isolated allergen. Twelve cysteine residues are gray-highlighted. Dashes: Peamaclein residues conserved in the homologues.

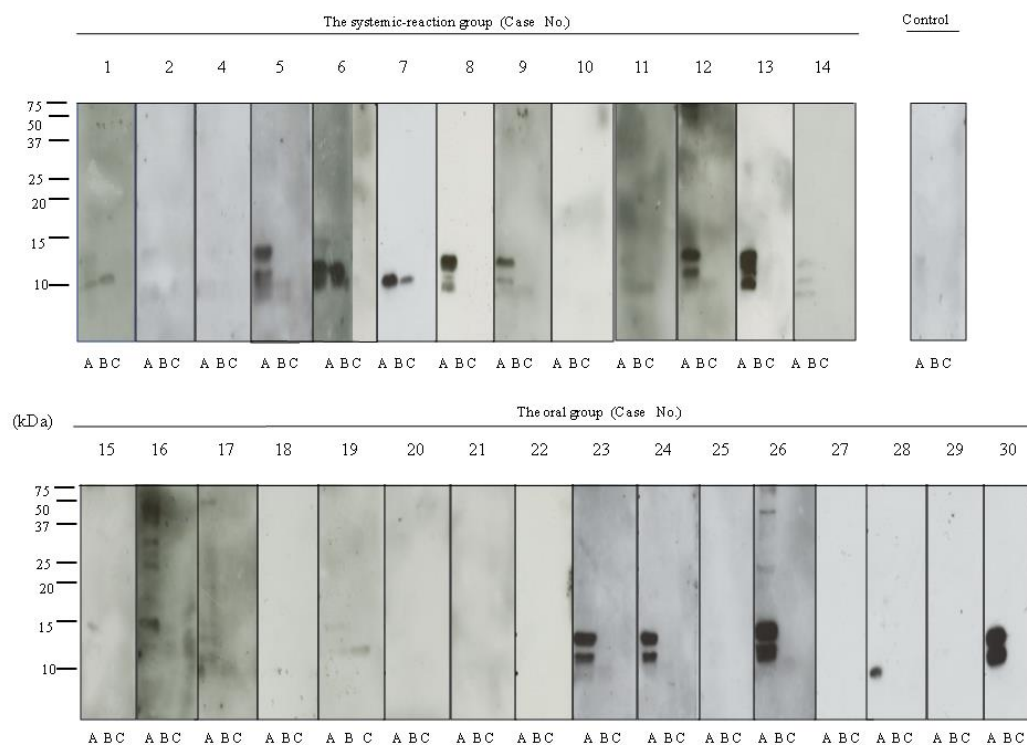


Fig. 3. IgE-immunoblotting with crude extract, purified Peamaclein, and LTP.
Number (1, 2, 4-30) and 'control' at the top: patients' numbers and the negative control. *Upper:* Systemic group and control results. *Lower:* Oral group results.

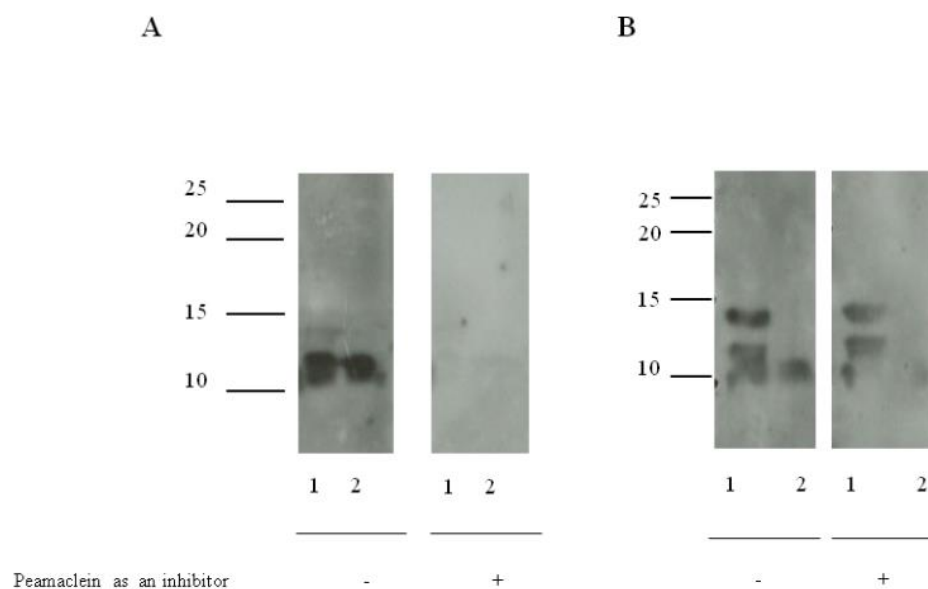


Fig. 4. Inhibition tests using IgE-immunoblotting.

Inhibition of IgE binding in CM extract (lane 1) and the purified Peamaclein (lane 2) after pre-incubation of two patients' serum (patient 6 [A] and 12 [B]) without (left) and with (right) the purified Peamaclein as an inhibitor.

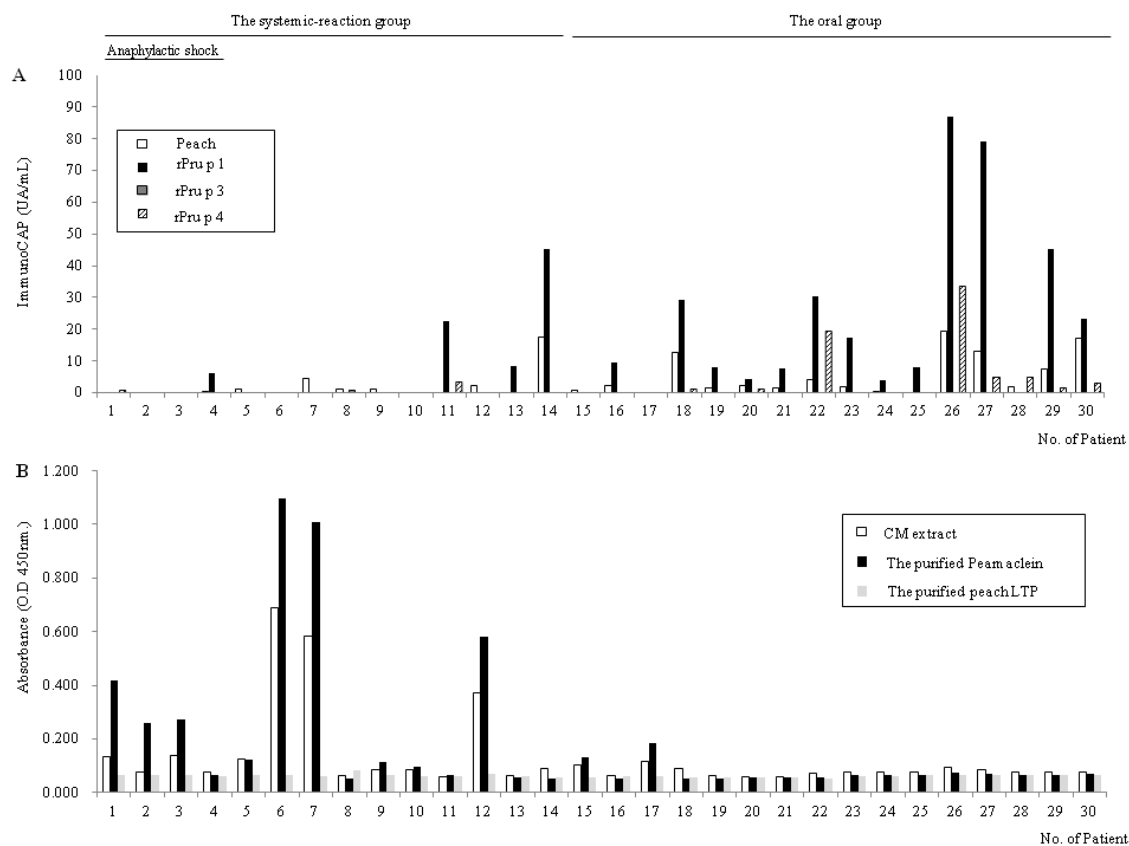


Fig. 5. Measurements of IgE specific to peach, rPru p 1, rPru p 3 and rPru p 4 by ImmunoCAP (A) and allergic activity of the purified Peamaclein and LTP by ELISA (B).
 LTP: lipid transfer protein.

Table 1 Clinical characteristics of patients with peach allergy

No of Patient	Age/ Sex	History	Other food allergy	Pollen sensitization ImmunoCAP (class)	Clinical symptoms after the ingestion of peaches							
					OAS	LT	CI	NS	U/A	AS	LOC	LBP
Systemic-reaction group												
1	30/M	PO	Strawberry, crab	Al (0), Ce (5), Gr(3) , Ra (2), Mu(1)	+	+					+	+
2	60/M	PO	Japanese apricot	Al (0), Ce (5), Gr ND , Ra ND, Mu (1)	+		+	+	U		+	
3	24/F	PO	Japanese apricot	Al (0), Ce (5), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)					U/A		+	
4	60/F	PO	Apple, pear, loquat, cherry, mungbean sprout	Al (3), Ce (4), Gr (0) , Ra (1), Mu (0)	+		+	+	U/A	+	+	
5	39/M	PO	Japanese apricot	Al (0), Ce (3), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)		+	+	+	U/A			
6	32/F	None	Apricot, fig, orange, grape, pineapple	Al (0), Ce (6), Gr (0) , Ra (4), Mu (0)	+		+	+	U/A			
7	14/M	PO	Apple, pear, Japanese apricot, orange	Al (0), Ce (6), Gr (0) , Ra (1), Mu (0)		+			U			
8	27/M	None	None	Al (0), Ce (0), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)		+			U			
9	31/F	PO	Apple, orange	Al (0), Ce (4), Gr (3) , Ra (3), Mu (1)	+	+		+	A	+		
10	16/M	PO, AR, BA	Apple, melon, orange,	Al (1), Ce (5), Gr (0) , Ra (2), Mu (1)	+	+			U			
11	41/F	PO, BA, AD	Cherry, tomato	Al (4), Ce (3), Gr (2) , Ra ND, Mu ND	+				U/A			
12	18/F	PO, AD	Japanese apricot, apple, strawberry	Al (2), Ce (6), Gr (3) , Ra (3) ,Mu (2)	+	+						
13	40/F	PO, BA	Apple, apricot, pear, persimmon, cucumber, watermelon	Al (4), Ce (0), Gr (0) , Ra (1) ,Mu (0)	+	+						
14	16/M	PO, AR, BA, AD	Apple, pear, soybeans, mungbean sprout	Al (5), Ce (6), Gr (2) , Ra (1) ,Mu (2)	+					+		

Oral group

15	50/F	PO	Apple, strawberry	Al (1), Ce (5), Gr (2) , Ra ND, Mu ND	+
16	55/F	PO, BA	Apple, cherry, pear, kiwi	Al (4), Ce (2), Gr (0) , Ra (0) ,Mu (0)	+
17	23/F	PO, AR, AC	None	Al (2), Ce (4), Gr (0) , Ra ND, Mu (0)	+
18	10/F	PO, AD	Apple, strawberry, grape, tomato, melon, cucumber, lychee	Al (5), Ce (4), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)	+
19	43/F	PO, AD	Cherry, loquat, kiwi, soybeans, mungbean sprout	Al (4), Ce (4), Gr (3) , Ra (3), Mu (2)	+
20	44/M	PO, BA	Apple	Al (3), Ce (3), Gr (2) , Ra (2), Mu (0)	+
21	51/F	PO	Apple, pear, strawberry, cherry, soybeans, kiwi, melon	Al (4), Ce (2), Gr (2) , Ra (0), Mu (0)	+
22	21/F	PO, AD	Apple, pear, strawberry, grapes, soybeans, mungbean sprouts	Al (5), Ce (5), Gr (3) , Ra (3), Mu (3)	+
23	10/F	PO	Apple, pear, kiwi, soybeans ,mungbean sprout, melon	Al (3), Ce (4), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)	+
24	42/F	PO	Apple, pear, kiwi, soybeans, mungbean sprout	Al (3), Ce (3), Gr (3) , Ra (0), Mu (0)	+
25	60/F	PO	Soybeans	Al (4), Ce (3), Gr (0) , Ra (0), Mu (0)	+
26	11/M	PO, AR, AD	Grapes, strawberry, melon, watermelon, mango, banana	Al (6), Ce (6), Gr (6) , Ra (4), Mu (3)	+
27	7/M	PO, AR, BA, AD	Apple, kiwi, tomato, melon, mungbean sprout, peanuts	Al (4), Ce (5), Gr (2) , Ra (3), Mu (2)	+
28	24/F	PO	Melon, cucumber, tomato, soybeans	Al (2), Ce (4), Gr (4) , Ra (3), Mu (2)	+
29	53F	PO, AR, AD	Cherry, banana, melon, pineapple	Al (4), Ce (4), Gr (1) , Ra (2), Mu (2)	+
30	14M	PO	Apple, pear, grape, tomato, kiwi, cherry, watermelon, banana, pineapple	Al (5), Ce (6), Gr (3), Ra (2), Mu (2)	+

A, angioedema; AD, atopic dermatitis; Al, Alder; AR, allergic rhinitis; AS, abdominal symptoms; BA, bronchial asthma; Ce, cedar; CI, conjunctiva injection; Gr, grass; LOC, loss of consciousness; LBP, low blood pressure ; LT, laryngeal tightness; Mu, mugwort; ND, not done; NS, nasal symptom; OAS, oral allergy syndrome; PO, pollinosis; Ra, ragweed; U, urticaria.

Table 2 Measurements of serum total IgE and specific IgE against peach allergens, rBet v 1 and rBet v 2 by ImmunoCAP

No of patient	Serum total IgE (IU/mL)	ImmunoCAP (UA/mL (class))					
		Peach	rPru p 1	rPru p 3	rPru p 4	rBet v1	rBet v 2
1	436	<0.34 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	0.68 (1)	<0.35 (0)	0.61 (1)
2	244	<0.34 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
3	487	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
4	168	0.34 (0)	6.07 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	13.0 (3)	<0.35 (0)
5	82	0.95 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
6	792	<0.34 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
7	281	4.50 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
8	48	1.26 (2)	<0.35 (0)	0.84 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
9	85	1.04 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
10	27	<0.34 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	0.53 (1)	<0.35 (0)	0.59 (1)
11	193	<0.34 (0)	22.6 (4)	<0.35 (0)	3.21 (2)	50.0 (5)	4.13 (3)
12	621	2.09 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
13	135	<0.34 (0)	8.42 (3)	<0.35 (0)	0.55 (1)	21.8 (4)	0.37 (1)
14	1207	17.4 (3)	45.3 (4)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	>100 (6)	<0.35 (0)
15	460	0.87 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
16	234	2.26 (2)	9.57 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	38.8 (4)	<0.35 (0)
17	168	<0.34 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	1.13 (2)	<0.35 (0)
18	477	12.6 (3)	29.1 (4)	<0.35 (0)	1.24 (2)	62.8 (5)	3.09 (2)
19	806	1.59 (2)	8.07 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	52.7 (5)	<0.35 (0)
20	481	2.16 (2)	4.24 (3)	<0.35 (0)	1.04 (2)	8.27 (3)	<0.35 (0)
21	162	1.37 (2)	7.45 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	<0.35 (0)
22	1598	3.98 (3)	30.3 (4)	<0.35 (0)	19.5 (4)	62.4 (5)	2.65 (2)
23	641	1.74 (2)	17.4 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	18.0 (4)	<0.35 (0)
24	71	0.55 (1)	3.84 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	5.43 (3)	<0.35 (0)
25	161	<0.35 (0)	7.93 (3)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	33.5 (4)	<0.35 (0)
26	1994	19.5 (4)	87.1 (5)	<0.35 (0)	33.7 (4)	>100 (6)	27.4 (4)
27	828	13.0 (3)	79.0 (5)	<0.35 (0)	4.86 (3)	94.3 (5)	4.55 (3)
28	293	1.68 (2)	<0.35 (0)	<0.35 (0)	4.74 (3)	<0.35 (0)	5.96 (3)
29	603	7.47 (3)	45.1 (4)	<0.35 (0)	1.62 (2)	81.1 (5)	1.45 (2)
30	932	17.0 (4)	23.3 (4)	<0.35 (0)	3.17 (2)	93.2 (5)	3.59 (3)

Table 3 Results of skin prick test using peach allergens in patients with peach allergy

Clinical severity	No. of patient	Mean diameter of wheal induced by skin prick tests (mm)						
		Histamine	Saline	Peach				
				Fresh peach	Fresh peach	CM	Peamaclein	LTP
				pulp	peel	extract		
The systemic-reaction group	3	8.3	2.8	10.0	ND	5.3	12.1	3.2
	4	9.6	0	17.1	ND	4.4	0	0
	5	12.2	0	11.9	6.3	9.9	12.5	6.7
	6	7.7	0	6.3	5.5	6.6	9.1	0
	7	9.0	0	11.0	ND	9.8	13.1	5.1
	Positivity (%)			100% (5/5)	100% (2/2)	80% (4/5)	80% (4/5)	40% (2/5)
The oral group	23	6.0	0	6.6	ND	2.7	0	0
	24	5.8	0	7.8	ND	3.2	0	0
	25	5.7	0	5.4	ND	0	0	0
	28	6.4	0	3.2	ND	0	0	0
	29	8.6	0	7.5	ND	4.6	0	0
	Positivity (%)			100% (5/5)	0% (0/0)	40% (2/5)	0% (0/0)	0% (0/0)

ND: not done.

References

- 1) Asero R, Cecchi L. Peach allergy. Beyond the classic 3 allergens? *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2011; 43:101-102.
- 2) Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy.* 1982; 37:437-443.
- 3) van Ree R, Fernández-Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden M, Aalberse RC. Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 95: 726-734.
- 4) Asero R, Monsalve R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 1033-1037.
- 5) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy.* 2002; 57: 900-906.
- 6) Maeda N, Inomata N, Morita A, Kirino M, Moriyama T, Ikezawa Z. Anaphylaxis due to peach with negative ImmunoCAP result to peach allergens, including rPru p 1, rPru p 3, and rPru p 4: a report of two cases. *Arerugi* 2009; 58: 140-147.
- 7) Mol Plant Microbe Interact. 1999 Jan;12(1):16-23. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F.
- 8) Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 2002; 128: 951-961.
- 9) Tuppo L, Alessandri C, Pomponi D, et al. Peamaclein - a new peach allergenic protein: similarities, differences and misleading features compared to Pru p 3. *Clin Exp Allergy.* 2013; 43: 128-140.
- 10) Björkstén F, Halmeperu L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy.* 1980; 35, 671-677.
- 11) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
- 12) Hirose J, Kitabatake N, Kimura A, Narita, H. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68, 2490-2497.
- 13) Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256, 495-497.

- 14) Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Allergy*. 1989; 44: 22-30.
- 15) Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot, and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*. 1983; 38: 167-172.
- 16) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P. Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 1009-1011.
- 17) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. PT with heat-processed apple peel extract to detect LTP hypersensitivity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2006; 38: 351-354.
- 18) Carnés J, Fernández-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy*. 2002; 57: 1071-1075.
- 19) Primavesi L, Brenna OV, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Influence of cultivar and processing on cherry (*Prunus avium*) allergenicity. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:9930-9935.
- 20) Fernández-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1239-1247.
- 21) Marzban G, Puehringer H, Dey R, et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci*. 2005; 169:387-394.
- 22) Borges JP, Jauneau A, Brulé C, et al. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem*. 2006; 44:535-542.

論文要旨

近年、消費者の間で食の安全・安心を求める声が強くなってきた。食に携わる者は科学的根拠に基づいて食の安全性を明確にし、正しい情報を消費者へ伝えることで安心を提供しなければならない。特に、農薬や食物アレルギーといった人々の健康に直結する分野では規制が厳しく、その検査法が研究されている。しかし、いくら安全性を示すための検査であっても、操作が煩雑で費用が高額な方法では検査対象が限られてしまう。そこで本研究では、迅速、簡便に食の安全性を確保するための検査方法の確立を目指し、免疫学的手法を用いることにした。

免疫学的手法で用いる抗体は、ポリクローナル抗体 (pAb) とモノクローナル抗体 (mAb) に大別される。pAb の作製は簡単であるが、エピトープの異なる抗体が混在しており、固体差が大きい。一方 mAb の作製には時間と技術が必要であるが、単一のエピトープに対する抗体であることを生かした解析が可能である上、一度樹立できれば均質な抗体を大量かつ半永久的に得られるという利点がある。

本研究では、まず mAb の手法を用いて農薬クロロタロニルの検出系を構築した。次に、代表的な植物アレルゲンである Lipid Transfer Protein (LTP) に対する評価系を構築した。さらに、LTP に対する mAb を作製する過程で Gibberellin Regulated Protein (GRP) という新規たんぱく質を発見したので、そのアレルゲン性について検討した。これらの研究は、いずれも mAb の特徴を最大限に生かしたものである。

第1章 野菜に残留する殺菌剤クロロタロニルを測定するための直接競合 ELISA の開発

野菜中に残留するクロロタロニル (TPN) を迅速・簡便に測定する直接競合 ELISA の開発を試みた。まず、ペンタクロロフェノールのカルボン酸誘導体を用いて mAb を作製した。得られた mAb のうち mAb TPN9A が TPN の測定に最も適していた。野菜中の TPN は、磨砕均一化後に作物由来の酵素によって速やかに分解することが知られている。その防止のために添加されるリン酸が測定結果を不安定にしたが、競合反応に用いるリン酸緩衝液のイオン強度を 100 mmol/L にすることでその影響を解消できた。至適化した直接競合 ELISA の測定範囲は、0.10~6.0 ng/mL、キュウリとナスへ添加した TPN は 78~105% と良好に回収できた。また、HPLC による定量結果とも高い相関性を認めた。開発した ELISA は、メタノール抽出とその希釈のみで、迅速・簡便に TPN を測定できた。

第2章 大麦 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いた ビールの品質管理評価系の確立

大麦粒中の LTP がアレルギー患者血清中の IgE と反応したことから、LTP は IgE 結合タンパク質であることを確認した。大麦粉から純化した LTP に対する mAb を作製し、サンドイッチ ELISA を確立した。この ELISA は 0.3~3ng/ml の範囲で定量することができ、小麦やはと麦、ライ麦とは交差しなかった。また、この ELISA を用いて酢や味噌、ビールなどの発酵食品中の大麦 LTP を検出することができた。同一品種のビールであれば、製造工場や製造日が異なっても LTP 濃度はほぼ一定であった。LTP はビールの泡の形成と安定性に寄与することに加えてアレルゲンであるため、ビール中の LTP 濃度をコントロールし、監視することは有益である。したがって、本定量系はビールの品質管理の適切な評価系として利用できると思われる。

第3章 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたリンゴ 使用量の評価系の確立

食品中のリンゴ使用量を評価するために、リンゴ LTP に対する mAb を作製した。得られた 5 抗体のうち 2 抗体を用いてサンドイッチ ELISA を確立することに成功した。この定量系は LTP を 0.03~10 ng/ml で検出可能であり、スモモには交差するものの、特定原材料表示推奨品目に含まれる他の果物には交差せず、リンゴ LTP 特異的であった。リンゴを皮と可食部にわけて抽出し、この定量系で定量したところ、LTP は皮に局在していることが確認できた。また、リンゴジュースや野菜ジュース、カレールーなどの、リンゴ使用加工食品においても LTP を定量することができた。

第4章 Gibberellin Regulated Protein はモモアレルギーにおける全身性 反応のマーカーアレルゲンである

日本のモモアレルギー患者では、欧州の重症マーカーである LTP に対する IgE が検出されることはまれである。我々は、LTP に対する研究の過程で GRP を見出し、そのアレルゲン性を検討した。まず、LTP, GRP に対する mAb を用いて抗体カラムを作製し、モモ果実から LTP, GRP を純化した。この純化抗原を用い、30 名のモモアレルギー患者に対して、ELISA, イムノブロット, プリックテストを実施した。GRP 陽性者は ELISA では重症群 7 例, 軽症群 1 例, イムノブロットでは重症群 7 例, 軽症群 0 例, プリックテストでは重症例 4/5 例, 軽症例 0/6 例であった。一方、LTP に陽性を示す者はわずかであり、その反応性も低かった。モモ LTP は皮に局在しているが GRP は果肉に多い傾向がある。モモを食べる際に皮をむくことが多い日本人においては、皮に局在する LTP よりも GRP の方がアレルギーの重症マーカーとして適切であることが示された。なお、現在モモ GRP は、Pru p 7 としてアレルゲンデータベースに登録されている。

公表

第1章 野菜に残留する殺菌剤クロロタロニルを測定するための直接競合 ELISA の開発

Fumiko Okazaki, Yuki Hirakawa, Yukie Yamaguchi(Murakami), Eiki Watanabe, Seiji Iwasa, Hiroshi Narita, Shiro Miyake

“Development of Direct Competitive ELISA for Residue Analysis of Fungicide Chlorothalonil in Vegetables”

(野菜に残留する殺菌剤クロロタロニルを測定するための直接競合 ELISA の開発)

Food Hygiene and Safety Science 投稿改訂中

第2章 大麦 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたビールの品質管理評価系の確立

Yukie Murakami - Yamaguchi, Junko Hirose, Kumiko Kizu, Fumiko Okazaki, Wataru Fujii, Hiroshi Narita

“Quality Control System for Beer Developed with Monoclonal Antibodies Specific to Barly Lipid Transfer Protein”

(大麦 Lipid Transfer Protein 特異的なモノクローナル抗体を用いたビールの品質管理システム)

Antibodies 2012, 1, 259-272

第3章 Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたリンゴ使用量の評価系の確立

岡崎史子, 山口 (村上) 友貴絵, 中村美幸, 廣瀬潤子, 成田宏史

「Lipid Transfer Protein に対するモノクローナル抗体を用いたリンゴ使用量の評価系の確立」

京都女子大学食物学会誌 67:31-36 (2012)

第4章 Gibberellin Regulated Protein はモモアレルギーにおける全身性反応のマーカーアレルゲンである

Naoko Inomata*, Fumiko Okazaki*, Tatsuya Moriyama, Yuki Nomura, Yukie Yamaguchi, tsutomu Honjho, Yukio Kawamura, Hiroshi Narita, Michiko Aihara

* These authors equally contributed to the study.

“Identification of Peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy”

(重症なモモアレルギーを引き起こすマーカーアレルゲンピマクラインの同定)
Annals of Allergy, Asthma & Immunology 印刷中

参考論文

Naoya Itsumura, Yasuji Inamo, Fumiko Okazaki, Fumie Teranishi, Hiroshi Narita, Taiho Kambe, Hiroko Kodama

“Compound Heterozygous Mutations in SLC30A2/ZnT2 Results in Low Milk Zinc Concentrations: A Novel Mechanism for Zinc Deficiency in a Breast-Fed Infant”

(低亜鉛母乳をもたらす SLC30/ZnT2 の複合ヘテロ接合体変異：母乳哺育児の亜鉛欠乏症の新規機構)

PLoS One 2013 May 31;8(5)

以上

謝辞

本研究の過程を通じて、終始熱心なご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して懇切なるご助言と激励をいただきました、京都女子大学 成田宏史教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、適切なご指導ならびにご助言をたまわりました、京都大学大学院 増田誠司准教授、財団法人京都高度技術研究所 三宅司郎氏、大和学園京都栄養医療専門学校 山口（村上）友貴絵准教授、大阪成蹊短期大学 木津久美子講師に深謝申し上げます。

また、本研究における有益な議論と情報ならびに技術提供をしていただきました、株式会社森永生科学研究所 本庄勉氏、近畿大学 森山達哉准教授、横浜市立大学 猪又直子准教授に深くお礼申し上げます。

京都女子大学食物栄養学科の教職員の皆様には、数々のご指導と励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。

京都女子大学での研究生活において多くを支えて下さった食品学第一研究室の皆様、大学院学生の皆様、本当にありがとうございました。

たくさんの方々にご指導いただき、支えられ、励まされて学位論文を完成させられたことに、感謝の気持ちでいっぱいです。孤独になりがちな研究生活において、周りの方々の優しさに救われることがたくさんありました。これからは、人を支えることができる人間になれるよう、精進してまいります。

最後に、私の長い学生生活を、誰より心配しながら応援し続けてくれた家族に、ありがとうを伝えたいと思います。